

Charakterisierung und gezielte Optimierung des primären Energiestoffwechsels von kontinuierlichen Zelllinien zur Produktion rekombinanter pharmazeutischer Proteine

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Christof Schulz
aus Dortmund

1. Referent: Prof. Dr. Roland Wagner

2. Referent: Prof. Dr. Adrian Schumpe

eingereicht am: 18.11.2002

mündliche Prüfung (Disputation) am: 04.03.2003

2003

(Druckjahr)

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch die Mentorin oder den Mentor/die Betreuerin oder den Betreuer der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Schulz, C., Irani, N., Wirth, M., van den Heuvel, J., and Wagner, R. Directed Optimization of the Energy Metabolism of Mammalian Production Cell Lines. (Poster) 16th ESACT Meeting, Lugano (1999).

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 1997 bis Dezember 2000 in der Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik des Bereichs Bioverfahrenstechnik der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) in Braunschweig unter wissenschaftlicher Betreuung von Herrn Prof. Dr. Roland Wagner angefertigt.

Der Firma Novo Nordisk A/S danke ich für die Bereitstellung finanzieller Mittel, die die Durchführung der vorliegenden Dissertation ermöglicht haben. Insbesondere danke ich Herrn Dr. Leo Snel und Herrn Dr. Leif Kongerslev.

Herrn Prof. Dr. Wolf-Dieter Deckwer danke ich für die Möglichkeit, die Dissertation in der GBF im Bereich Bioverfahrenstechnik durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Adrian Schumpe danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Roland Wagner für die interessante Themenstellung, seine gute Betreuung, zahlreichen Anregungen und ständige Diskussionsbereitschaft, wodurch er wesentlich zu dieser Arbeit beigetragen hat.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin Herrn Dr. Joop van den Heuvel, Herrn Dr. Manfred Wirth und Frau Ute Widow, die durch ständige Hilfeleistungen, viele Anregungen und durch die Bereitstellung zahlreicher Materialien ganz wesentlich zum molekulargenetischen Teil dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik für die gute Zusammenarbeit, das angenehme Arbeitsklima und die zahlreichen Unterstützungen bei vielen Experimenten. Besonders danken möchte ich Herrn Herbert Krafft für die Unterstützung bei der Kultivierung von Zellen und bei der Durchführung des Pyruvat-Carboxylase-Tests sowie Frau Kristin Anastassiadis für die Hilfe bei der Nukleotidanalytik und Proteinbestimmung und zahlreichen Anregungen bei der Durchführung von vielen Experimenten. Herrn Joachim Hammer danke ich für die Durchführung der Aminosäureanalytik. Bei Herrn Gerd-Walter Piehl möchte ich mich für die Hilfe bei allen EDV-Fragen bedanken. Herrn Ingo Büssing danke ich für die Durchführung von Experimenten zur Kultivierung der Zelllinie CHO DG44 im Rahmen seiner Studienarbeit.

Frau Christina Büssing danke ich für die kritische Durchsicht dieses Manuskripts.

Der GBF danke ich für die guten Arbeitsbedingungen und die Bereitstellung von Geräten.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, die mir durch ihre viele Hilfe das Studium und damit diese Dissertation ermöglicht haben.

Inhaltsverzeichnis		Seite
Inhaltsverzeichnis		I
Abkürzungen und Symbole		X
1	Einleitung	1
1.1	Produktion von pharmazeutischen Proteinen mit tierischen Zellkulturen	1
1.2	Primärmetabolismus von kontinuierlichen Säugerzelllinien	6
1.2.1	Glucosemetabolismus	6
1.2.2	Glutaminmetabolismus	9
1.2.3	Aminosäurestoffwechsel in kontinuierlichen Säugetierzelllinien	13
1.3	Optimierung von Produktionsprozessen mit kontinuierlichen Säugetierzelllinien durch Metabolic Control und Metabolic Design	14
1.4	Strategie zur Optimierung des Primärmetabolismus von Säugerzelllinien durch Einführung einer rekombinanten cytosolischen Pyruvat-Carboxylase	19
1.5	Charakteristik der Pyruvat-Carboxylase aus Hefe	22
1.6	Amplifikation von Genen in CHO-Zellen	24
1.7	Aufgabenstellung und Zielsetzung	26
2	Material und Methoden	29
2.1	Zellkulturtechniken	29

2.1.1	Zellen	29
2.1.1.1	Säugerzelllinien	29
2.1.1.1.1	CHO DG44/D3	29
2.1.1.1.2	CHO DG44/D3 PYC2-Klone	29
2.1.1.1.3	CHO DG44/D3 pAG-MK	29
2.1.1.1.4	CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK	30
2.1.1.1.5	CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK	30
2.1.1.2	Prokaryonten	30
2.1.1.2.1	<i>Escherichia coli</i> TG1	30
2.1.1.2.2	<i>Escherichia coli</i> TG1 PYC2	31
2.1.1.2.3	<i>Escherichia coli</i> Top 10	31
2.1.1.2.4	<i>Escherichia coli</i> Top 10 pAdD26SV(A)-3	31
2.1.1.2.5	<i>Escherichia coli</i> Top 10 pTKGH	31
2.1.1.2.6	<i>Escherichia coli</i> Top 10 pSBC-1	31
2.1.1.2.7	<i>Escherichia coli</i> Top 10 pSBC-2	31
2.1.1.2.8	<i>Escherichia coli</i> Top 10 pSBC-1-HGH	32
2.1.1.2.9	<i>Escherichia coli</i> Top 10 pSBC-2-PYC2	32
2.1.1.3	Hefen	32
2.1.1.3.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> GX1	32
2.1.2	Nährmedien	32
2.1.2.1	Nährmedien zur Kultivierung von Säugerzelllinien	32
2.1.2.1.1	MEM Alpha Medium	32
2.1.2.1.2	MEM Alpha NOVO High Glucose	33
2.1.2.1.3	Serum	33
2.1.2.1.4	Geneticinhaltiges Selektionsmedium	34
2.1.2.1.5	MEM Alpha Select- High Glucose	34
2.1.2.1.6	MEM Alpha Select- High Glucose mit Methotrexat	35

2.1.2.1.7	Kryomedium CHO NOVO	35
2.1.2.1.8	Kryomedium CHO NOVO w/o	36
2.1.2.2	Nährmedien zur Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	36
2.1.2.2.1	LB Medium (Luria-Bertani Medium)	36
2.1.2.2.2	LB Selektionsmedium mit Ampicillin	36
2.1.2.2.3	LB Selektionsmedium mit Tetracyclin	37
2.1.2.2.4	Agarhaltiges LB Selektionsmedium mit Ampicillin	37
2.1.2.2.5	Agarhaltiges LB Selektionsmedium mit Tetracyclin	37
2.1.2.3	Nährmedium zur Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> GX1	38
2.1.2.3.1	YNB-Stammlösung	38
2.1.2.3.2	Glucosestammlösung	38
2.1.2.3.3	YNB-Medium	38
2.1.3	Kultivierung von Zellen	38
2.1.3.1	Kultivierung von Säugerzellen	38
2.1.3.1.1	Stammhaltung von adhärent wachsenden Zellen	39
2.1.3.1.2	Stammhaltung von in Suspension wachsenden Zellen	39
2.1.3.1.3	Subklonierung von transfizierten Zellen	40
2.1.3.1.4	Kryopräservierung	40
2.1.3.2	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	41
2.1.3.2.1	Kultivierung	41
2.1.3.2.2	Kryopräservierung	41
2.1.3.3	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> GX1	41
2.1.3.3.1	Kultivierung	41
2.1.3.3.2	Kryopräservierung	41
2.1.4	Begleitende Analytik bei Säugerzellkultivierungen	42
2.1.4.1	Bestimmung der Zellkonzentration	42
2.1.4.2	Bestimmung der Zellvitalität	42

2.1.4.3	Bestimmung der Glucose- und Lactatkonzentration	42
2.1.4.4	Bestimmung der Konzentration freier Aminosäuren	43
2.1.4.5	Bestimmung der Konzentration von Human Growth Hormone	43
2.1.4.6	Bestimmung der intrazellulären Nukleotidkonzentrationen	44
2.1.4.6.1	Extraktion der Nukleotide	44
2.1.4.6.2	HPLC-System zur Quantifizierung der extrahierten intrazellulären Nukleotide aus Säugerzellen	44
2.1.4.7	Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration	45
2.1.4.7.1	Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration nach Bradford	45
2.1.4.7.2	Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration mit der BCA-Methode	46
2.2	Aktivitätsbestimmung der Pyruvat-Carboxylase	47
2.2.1	Extraktionspuffer	47
2.2.1.1	Puffer zur Enzymextraktion aus Säugerzellen	47
2.2.1.2	Puffer zur Enzymextraktion aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
2.2.2	Zellaufschluss	47
2.2.2.1	Aufschluss von Säugerzellen	47
2.2.2.2	Aufschluss von Hefezellen	48
2.2.3	Enzymreaktion und Messmethode	48
2.2.4	Bestimmung der Enzymaktivität	50
2.3	Nachweis der Transkription des für die Pyruvat-Carboxylase codierenden Gens durch Northern Blotting	50
2.3.1	Isolierung der RNA aus Säugerzelllinien	50
2.3.2	Auftrennung der isolierten RNA durch Gelelektrophorese	51
2.3.2.1	Präparation des Formaldehyd-Gels	51
2.3.2.2	Präparation der RNA-Proben für die Gelelektrophorese	52
2.3.2.3	Gelelektrophorese	53

2.3.3	Transfer der RNA auf eine Hybond-N-Membran (Northern Blot)	53
2.3.4	Herstellung einer DNA-Sonde aus doppelsträngiger DNA durch Random Priming	54
2.3.5	Kontrollsonde aus β -Actin-DNA	56
2.3.6	Hybridisierung der RNA-Blots	57
2.3.7	Hybridisierung der Northern-Blots mit einzelsträngigen Sonden	59
2.4	Amplifikation von Plasmiden in <i>Escherichia coli</i> und Transfektion von Säugerzelllinien	61
2.4.1	Transformation von kompetenten <i>Escherichia coli</i> mit Plasmid-DNA durch Elektroporation	62
2.4.2	Isolierung der Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	63
2.4.2.1	Minipräparationen	63
2.4.2.2	Maxipräparationen	64
2.4.2.3	Restriktionsanalyse der isolierten Plasmid-DNA	65
2.4.2.3.1	Restriktionsanalyse	65
2.4.2.3.2	Gelbeladungspuffer	65
2.4.2.3.3	Agarosegele	66
2.4.2.3.4	Elektrophorese	67
2.4.3	Transfektion von Säugerzelllinien mit Plasmid-DNA	67
2.5	Berechnete Größen	69
2.5.1	Spezifische Wachstumsrate	69
2.5.2	Produktbildungs- und Substratverbrauchsrate	69
2.5.3	Kennzahlen aus den Nukleotidpools von Säugerzellen	70
3	Ergebnisse	71

3.1	Einführung der Pyruvat-Carboxylase 2 aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in die Zelllinie CHO DG44/D3 und Selektion mit Geneticin	71
3.1.1	Transfektion und Selektion	71
3.1.2	Transkription der PYC2 in selektierten Zellklonen	72
3.1.3	Bestimmung der Aktivität der Pyruvat-Carboxylase 2	77
3.1.3.1	Nachweis der PYC-Aktivität im Rohextrakt von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	77
3.1.3.2	Bestimmung der PYC2-Aktivität in Rohextrakten der CHO DG44/D3-Klone PYC2-B2 und pAG-MK	77
3.1.4	Wachstum und Energiemetabolismus von PYC2-Klonen der Zelllinie CHO DG44/D3	78
3.1.4.1	Zellwachstum	79
3.1.4.2	Zellspezifische Glucoseverbrauchsdaten und Lactatbildungsdaten	81
3.1.4.3	Zellspezifische Glutaminverbrauchsdaten	84
3.1.4.4	Glucose- und Lactatkonzentrationen im Kulturüberstand	86
3.1.5	Zusammenfassung	88
3.2	Konstruktion eines bicistronischen Plasmids mit den Genen für Human Growth Hormone und Pyruvat-Carboxylase	89
3.2.1	Strategie zur Herstellung des bicistronischen Plasmids	89
3.2.2	Konstruktion des bicistronischen Plasmids mit Hilfe der Plasmide pSBC-1 und pSBC-2	89
3.2.3	Konstruktion des Plasmids pSBC-1-HGH	91
3.2.4	Konstruktion des Plasmids pSBC-2-PYC2	97
3.2.5	Konstruktion des Plasmids pSBC-1/2-HGH/PYC2	102

3.3	Transfektion der Zelllinie CHO DG44/D3 mit dem bicistronischen Plasmid mit den Genen für das Modellprotein Human Growth Hormone und Pyruvat-Carboxylase 2	108
3.3.1	Transfektion und Selektion	108
3.3.2	Aktivität der PYC2	109
3.3.3	Wachstum und Energiemetabolismus	110
3.3.3.1	Zellwachstum	110
3.3.3.2	Zellspezifische Substratverbrauchs- und Lactatbildungsraten	112
3.3.4	Produktion von Human Growth Hormone	116
3.3.4.1	HGH-Konzentration im Kulturüberstand	116
3.3.4.2	HGH-Produktionsraten	118
3.3.5	Nukleotidpools	120
3.3.5.1	Untersuchung des Wachstumsverhaltens durch Bestimmung des NTP- und U-Werts	120
3.3.5.2	Zellspezifische ATP- und GTP-Konzentration	124
3.3.5.3	Bestimmung des UDPGNAC-Pools	125
3.3.6	Überblick	127
4	Diskussion	130
4.1	Expression der Pyruvat-Carboxylase 2 in der Zelllinie CHO DG44/D3 nach der Transfektion mit dem monocistronischen Vektor pCMVSHE-PYC2	133
4.1.1	Transkription des PYC2-Gens	133
4.1.2	Enzymaktivität der PYC2	135
4.1.3	Optimierung der PYC2-Expression	137
4.2	Wachstumsverhalten der Zelllinie CHO DG44/D3 nach der Transfektion mit dem monocistronischen Vektor pCMVSHE-PYC2	138

4.3	Substratnutzung und Lactatproduktion der Zelllinie CHO DG44/D3 nach der Transfektion mit dem monocistronischen Vektor pCMVSHE-PYC2	139
4.3.1	Glucose- und Glutaminverbrauchsraten	139
4.3.2	Lactatproduktionsraten	140
4.3.3	Vergleich von Substratverbrauch und Lactatproduktion der PYC2 exprimierenden Zelllinien CHO DG44/D3 und BHK-21 A	141
4.4	Expression der Pyruvat-Carboxylase 2 in der Zelllinie CHO DG44/D3 nach der Transfektion mit dem bicistronischen Vektor pSBC-1/2-HGH/PYC2	145
4.5	Produktion von Human Growth Hormone nach Transfektion der Zelllinie CHO DG44/D3 mit dem bicistronischen Plasmid pSBC-1/2-HGH/PYC2	149
4.6	Wachstumsverhalten, Substratverbrauch und Lactatproduktion der Zelllinie CHO DG44/D3 nach der Transfektion mit dem bicistronischen Vektor pSBC-1/2-HGH/PYC2	149
4.7	Nukleotidpools der Zelllinien CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK und CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK	150
4.7.1	NTP-Wert	150
4.7.2	U-Wert	151
4.7.3	NTP/U-Wert	152
4.7.4	Zellulärer ATP- und GTP-Gehalt	152
4.7.5	Zellulärer UDPGNac-Gehalt	153
5	Zusammenfassung und Ausblick	155
6	Literaturverzeichnis	159

7	Anhang	185
----------	---------------	------------

Abkürzungen und Symbole

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CIP	Calf Intestinal Phosphatase
CMP	Cytidinmonophosphat
CTP	Cytidintriphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dFCS	Dialyzed Fetal Calf Serum
DHFR	Dihydrofolat-Reductase
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immuno-Sorbent Assay
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EPO	Erythropoietin
FA	Formaldehyd

FCS	Fetal Calf Serum
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
G	Guanin
GTP	Guanosintriphosphat
HEBS	Hepes Buffered Saline
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
HGH	Human Growth Hormone
IRES	Internal Ribosomal Entry Site
K_M	Michaelis Konstante; Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit eines Enzyms erfolgt
MK	Mischklon
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MTX	Methotrexat
MWCB	Master Working Cell Bank
NeuAc	N-Acetylneuraminsäure
NTP	Nucleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Pyruvat-Carboxylase (mitochondrial lokalisiert)
PCA	Perchlorsäure
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PDHK	Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
POD	Peroxidase
PYC	Yeast Pyruvate Carboxylase (Pyruvat-Carboxylase aus Hefe)
RNA	Ribonucleinsäure
SAR	Scaffold Attached Regions
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin

T_{Hyb}	Hybridisierungstemperatur
T_{m}	Schmelztemperatur
TBA	Tetrabutylammoniumhydrogensulfat
tPA	Tissue Plasminogene Activator
tRNA	transfer RNA
TTP	Thymidintriphosphat
U	Uracil
UDP	Uridindiphosphat
UDPGalNAc	UDP-N-Acetylgalactosamin
UDPGlucNAc	UDP-N-Acetylglucosamin
UDPGNAc	Summe aus UDPGalNAc und UDPGlucNAc
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
Vhb	<i>Vitreoscilla</i> Hämoglobin

Einheiten

bp	Basenpaare
kb	Kilobasen (1000 Basen)
M	mol l^{-1}
U	1 Internationale Einheit (unit): Umsatz von 1 Mikromol pro Minute; 1 U = 16,67 nkat

1 Einleitung

1.1 Produktion von pharmazeutischen Proteinen mit tierischen Zellkulturen

Die Produktion rekombinanter pharmazeutisch einsetzbarer Proteine für die Humantherapie hat in den letzten zehn Jahren sehr stark an Bedeutung gewonnen. Bei den Produkten handelt es sich vorwiegend um biologisch aktive Proteine wie Hormone, Cytokine, Antikörper oder Enzyme. Aus einem Mangel oder einer Fehlfunktion eines solchen Proteins resultieren viele Krankheiten. Die Therapie dieser Krankheiten kann in einer Applikation des entsprechenden pharmazeutischen Proteins bestehen.

Mit den Erfolgen gentechnischer Klonierungsmethoden in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde die Rekombinationstechnologie etabliert, durch die speziefremde Gene in Mikroorganismen (Gassen, 1991) und tierische Zellen (Urlaub und Chasin, 1980; Kaufman und Sharp, 1982; Wirth et al., 1988; Sandig et al., 1997) eingebracht und exprimiert werden konnten. Durch diese neue Technologie wurde der Weg zur Produktion rekombinanter pharmazeutischer Proteine mit prokaryontischen und eukaryontischen Zellen geebnet. Die gleichzeitige Entwicklung der Hybridomtechnik für Säugetierzellen ermöglichte die Herstellung monoklonaler Antikörper mit Hybridomzelllinien (Köhler und Milstein, 1975). Durch den Einsatz von rekombinanten pro- und eukaryontischen Zellen sowie Hybridomzellen werden seit Beginn der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts hochwertige pharmazeutische Proteine für Diagnostik und Therapie im industriellen Maßstab hergestellt (Chmiel, 1991b). Dadurch sind traditionelle Produktionsprozesse zur Gewinnung von pharmazeutisch nutzbaren Proteinen aus Blut oder Organen immer weiter zurückgedrängt worden, da bei derartigen Prozessen auch Krankheitserreger wie beispielsweise Hepatitis-Viren oder Humane Immundefizienz-Viren (HIV) in das Produkt gelangen können. Bei gentechnisch hergestellten Präparaten hingegen besteht diese Gefahr nicht.

Zunächst wurden Prozesse zur Herstellung von rekombinanten pharmazeutischen Proteinen mit prokaryontischen Mikroorganismen etabliert. Die Vorteile hierbei liegen in der hohen Biomasseproduktivität und der relativ einfachen Steuerung der Produk-

tionsprozesse. Daraus resultieren niedrige Investitions- und Betriebskosten (Chmiel, 1991b). Im Gegensatz zu Säugetierzelllinien sind Prokaryonten jedoch nicht in der Lage, die Faltung der produzierten Proteine zu einer biologisch aktiven Tertiärstruktur vorzunehmen. Des weiteren fehlt ihnen die Fähigkeit zur Durchführung von human-ähnlichen, posttranslationalen Modifikationen wie Glykosylierung, Acetylierung, Amidierung, Carboxylierung, Phosphorylierung und Sulfatierung (Chmiel, 1991b). Die korrekte Faltung des Proteins und die Genauigkeit der posttranslationalen Modifikationen, insbesondere der Glykosylierung, sind oftmals Voraussetzung für die therapeutische Nutzbarkeit eines Proteins, da sie die mittlere Verweilzeit (*clearance rate*), Löslichkeit und Immunogenität des Proteins im Körper bestimmen und das Protein vor Proteasen schützen können (Conradt et al., 1989; Tsuda et al., 1990; Rasmussen, 1991; Goochee et al., 1991; Jenkins und Curling, 1994). Daher werden die Produktionsprozesse zur Herstellung von posttranslational modifizierten, therapeutisch verwendeten Proteinen und monoklonalen Antikörpern mit Säugetierzelllinien durchgeführt.

Ein weiteres Produktionssystem für hochkomplexe pharmazeutische Proteine stellen transgene Tiere dar (Krimpenfort et al., 1991). Die Nachteile dieses Produktionsverfahrens jedoch liegen in den vergleichsweise langen Entwicklungszeiten und hohen Infektionsrisiken (Clark et al., 1989; Houdebine, 1994), so dass die Expression von Genen für posttranslational modifizierte komplexe pharmazeutische Proteine derzeit in Säugetierzelllinien durchgeführt wird.

In Tabelle 1.1 sind einige mit rekombinanten Säugetier- oder Hybridomzelllinien hergestellte pharmazeutische Proteine aufgelistet (Chmiel, 1991b; Walsh und Headdon, 1994; <http://www.genzyme.com>; <http://www.gene.com>; <http://www.lilly.com>). Diese Produkte sind bereits kommerziell erhältlich.

Die Ziele der pharmazeutischen Industrie bei der Optimierung von Produktionsprozessen von rekombinanten pharmazeutischen Proteinen mit Säugetierzelllinien liegen zum einen in der Entwicklung von kostengünstigen Herstellungsverfahren. Hierzu trägt die Verbesserung der Produktivität der Zellen maßgeblich bei. Zum anderen wird die Optimierung der Qualität der produzierten pharmazeutischen Proteine angestrebt.

Die Prozessentwicklung in der Zellkulturtechnologie basiert auf vier verschiedenen Ansätzen:

1. Optimierung der Bioreaktorsysteme
2. Optimierung der Nährmedien
3. Optimierung der Temperaturführung
4. Optimierung der Zellphysiologie

Tab. 1.1: Rekombinant erzeugte pharmazeutische Proteine

Produkt-name	Protein	Firma	Applikation	Status
Epogen	Erythropoetin	Amgen	Anämie in Verbindung mit Nervenversagen	1989 zugelassen
Actimmune	Interferon- γ 1b	Genentech	Chronische Granulomatose	1990 zugelassen
Activase	Tissue Plasminogen Activator (tPA)	Genentech	akute Lungenembolie, akuter Herzinfarkt	1990 zugelassen
Leukine	Granulocyte-Macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)	Immunex	Knochenmarktransplantationen	1993 zugelassen
Betaseron	Interferon- β	Schering	Multiple Sklerose	1993 zugelassen
Cerezyme	β -Glucocerebrosidase	Genzyme	Gaucher-Krankheit	1996 zugelassen
Herceptin	anti-HER2-Antikörper	Genentech	Brustkrebs	1998 zugelassen
Xigris	Activated Protein C (aPC)	Eli Lilly	Sepsis	2001 zugelassen

Die ersten drei Ansätze zielen auf eine Prozessoptimierung durch Veränderung des extrazellulären Milieus ab, der letzte Ansatz hingegen soll eine Prozessoptimierung

durch Veränderung der intrazellulären Abläufe in der Zelle und damit eine Beeinflussung der Zellphysiologie bewirken.

Bei der Optimierung von Bioreaktoren für die Kultivierung von Säugetierzellen ist in den letzten zwanzig Jahren intensive Forschung betrieben worden, so dass die heutzutage verwendeten Bioreaktoren einen sehr hohen Entwicklungsstandard aufweisen. Säugetierzelllinien sind, bedingt durch das Fehlen einer Zellwand, sehr scherempfindlich. Demzufolge muss ein Bioreaktor bei der Kultivierung von Säugetierzellen alle Anforderungen in Bezug auf scherarme Durchmischung, Sauerstoffeintrag, pH-Regulierung und Steriltechnik erfüllen (Chmiel, 1991b). Bioreaktoren zur Kultivierung von Säugerzellen werden sowohl satzweise als auch kontinuierlich betrieben. Die meistverwendeten Reaktortypen sind Rührkesselreaktoren, Wirbelschichtreaktoren, Hohlfasermodule und Airliftreaktoren (Lehmann et al., 1988; Leist et al., 1990; Chmiel, 1991b; Handa-Corrigan, 1992; Hellenbroich, 1995; Waugh, 1999).

Das Medium für die Kultur von Säugerzellen muss unter *in vitro*-Bedingungen eine Umgebung schaffen, die die zelluläre Reaktivität und funktionelle Integrität der Zelle erhält und fördert. Die Entwicklung derartiger Medien begann bereits vor vierzig Jahren mit der Formulierung der Basalzusammensetzung vieler heutzutage verwendeter Kulturmedien (Eagle, 1959). Diese Zellkulturmedien setzen sich im wesentlichen aus Aminosäuren, Salzen und Vitaminen zusammen und enthalten außerdem Glucose und Glutamin als Energiequellen. Vielfach wird den Nährmedien tierisches oder humanes Serum zugesetzt um ein optimales Wachstum der Zellen über längere Zeit zu gewährleisten. Bei der Medienoptimierung stand die Entwicklung serumfreier und proteinfreier Kompositionen im Vordergrund. Seren und Proteinsupplemente stellen einen hohen Kostenfaktor dar. Zudem können die Seruminhaltsstoffe chargenspezifisch qualitativ und quantitativ stark variieren, so dass eine Kultivierung unter definierten Bedingungen nicht durchführbar ist (Lindl und Bauer, 1994). Außerdem ist es möglich, dass Mikroorganismen, insbesondere Viren, trotz steriler Herstellung der Seren in die Zellkulturen gelangen (Bertheussen, 1993; Lindl und Bauer, 1994). Proteinsupplemente des Kulturmediums erschweren oftmals die anschließende Produktaufarbeitung. Aus diesen Gründen gewinnt die Verwendung von proteinfreiem

Nährmedium (Griffiths, 1987; Nagira et al., 1995; Scharfenberg und Wagner, 1995; Zang et al., 1995) zunehmend an Interesse und Bedeutung.

Eine weitere Strategie zur Erhöhung der Produktivität kontinuierlicher Säugerzellen stellt die Temperaturführung dar (Sureshkumar und Mutharasan, 1991; Weidemann et al., 1994; Kaufmann et al., 1999). Die Erniedrigung der Kultivierungstemperatur bewirkt im Allgemeinen eine Reduktion des Zellwachstums und eine Erhöhung der Vitalität (Kaufmann et al., 1999). Der Effekt verringerter Temperatur auf die Produktivität der Zellen differiert jedoch bei verschiedenen Zelllinien und Expressionssystemen (Kaufmann et al., 1999). Sureshkumar und Mutharasan (1991) beobachteten den Verlust der Produktivität einer Hybridomzelllinie nach Erniedrigung der Kultivierungstemperatur. Kaufmann et al. (1999) untersuchten den Einfluss der Kultivierungstemperatur auf die Produktivität einer CHO K1-Zelllinie. Die Reduktion der Temperatur von 37 °C auf 30 °C erbrachte eine 1,7-fache Erhöhung der zellspezifischen Produktivität und eine 3,4-fache Steigerung der gesamten Produktausbeute, bedingt durch die Verlängerung der Produktionsphase der Zellen.

Der vierte Ansatzpunkt der Optimierung von Produktionsprozessen mit Säugerzellkulturen zielt auf eine Veränderung der Zellphysiologie durch Eingriff in den Zellmetabolismus ab. Dabei werden zwei Strategien unterschieden: *Metabolic Control* und *Metabolic Design*; letzteres wird auch als *Metabolic Engineering* bezeichnet.

Das Ziel des *Metabolic Control* ist eine Kontrolle des Zellmetabolismus durch extrazelluläre Effektoren oder Substratdosierungen (Glacken, 1988; Murray, 1992). *Metabolic Design* oder *Metabolic Engineering* bedeutet eine gezielte Veränderung des Metabolismus der Zelle durch gentechnische Methoden (Bailey, 1991; Sahm, 1993; Stephanopoulos und Sinskey, 1993). Säugerzelllinien unterscheiden sich hinsichtlich ihres Metabolismus und ihrer Physiologie zum Teil beträchtlich von primären Gewebezellen (siehe 1.2). Aufgrund der hohen Komplexität ihres Stoffwechsels bestehen zahlreiche Möglichkeiten durch gezieltes *Metabolic Engineering* eine Optimierung der Zellphysiologie zu erreichen. Auf diese Weise werden Steigerungen der Wachstumsraten, des Energielevels und der Produktivitäten angestrebt (Ko et al., 1995), ebenso Verbesserungen der Produktqualität (z. B. der Proteinglycosylierung) (Schlenke et al.,

1999). Die Begriffe *Metabolic Control* und *Metabolic Design* werden in 1.3 näher erläutert.

1.2 Primärmetabolismus von kontinuierlichen Säugerzelllinien

Der Primärmetabolismus von kontinuierlichen Säugerzelllinien weist gegenüber dem Stoffwechsel primärer Zellen einige Unterschiede auf. So haben Säugerzelllinien im Vergleich zu Primärzellen einen erhöhten Bedarf an Substraten, vor allem an Glutamin, da sie nicht in der Lage sind, die ihnen zur Verfügung gestellten Energiequellen effektiv zu nutzen; dadurch scheiden sie unvollständig oxidierte Intermediate in den Kulturüberstand aus. Bei der Kultivierung kommt es zur Freisetzung von Lactat und Ammonium. Durch die Akkumulation dieser beiden Substanzen im Kulturmedium wird das Wachstum der Zellen inhibiert, die Zellvitalität verringert und zudem die Produktqualität vermindert (siehe unten).

Im Folgenden werden primäre Stoffwechselwege von kontinuierlichen Zelllinien erläutert und mit dem Metabolismus von Primärzellen verglichen.

1.2.1 Glucosemetabolismus

Glucose ist eine Hauptenergiequelle für tierische Zellen. Sie wird in der Glycolyse zu Pyruvat umgesetzt (Stryer, 1990). Bei primären Gewebezellen und auch Insektenzellen gelangt das Pyruvat durch Symport mit einem Proton durch die Mitochondrienmembran in das Mitochondrium, wo es zu CO_2 und H_2O oxidiert wird (Karlson, 1988). Kontinuierliche Säugerzelllinien hingegen setzen 80 bis 99,8 % der Glucose zu Lactat und Alanin um (Glacken et al., 1986; Lanks und Li, 1988; Bedard et al., 1993; Fitzpatrick et al., 1993; Petch und Butler, 1994). Neermann (1996) konnte anhand von Experimenten mit BHK-21-Zellen zeigen, dass der Flux von Glucose in den Citratzyklus weniger als 0,64 % des gesamten glycolytischen Flux beträgt. Die annähernd

Pentosephosphatweg

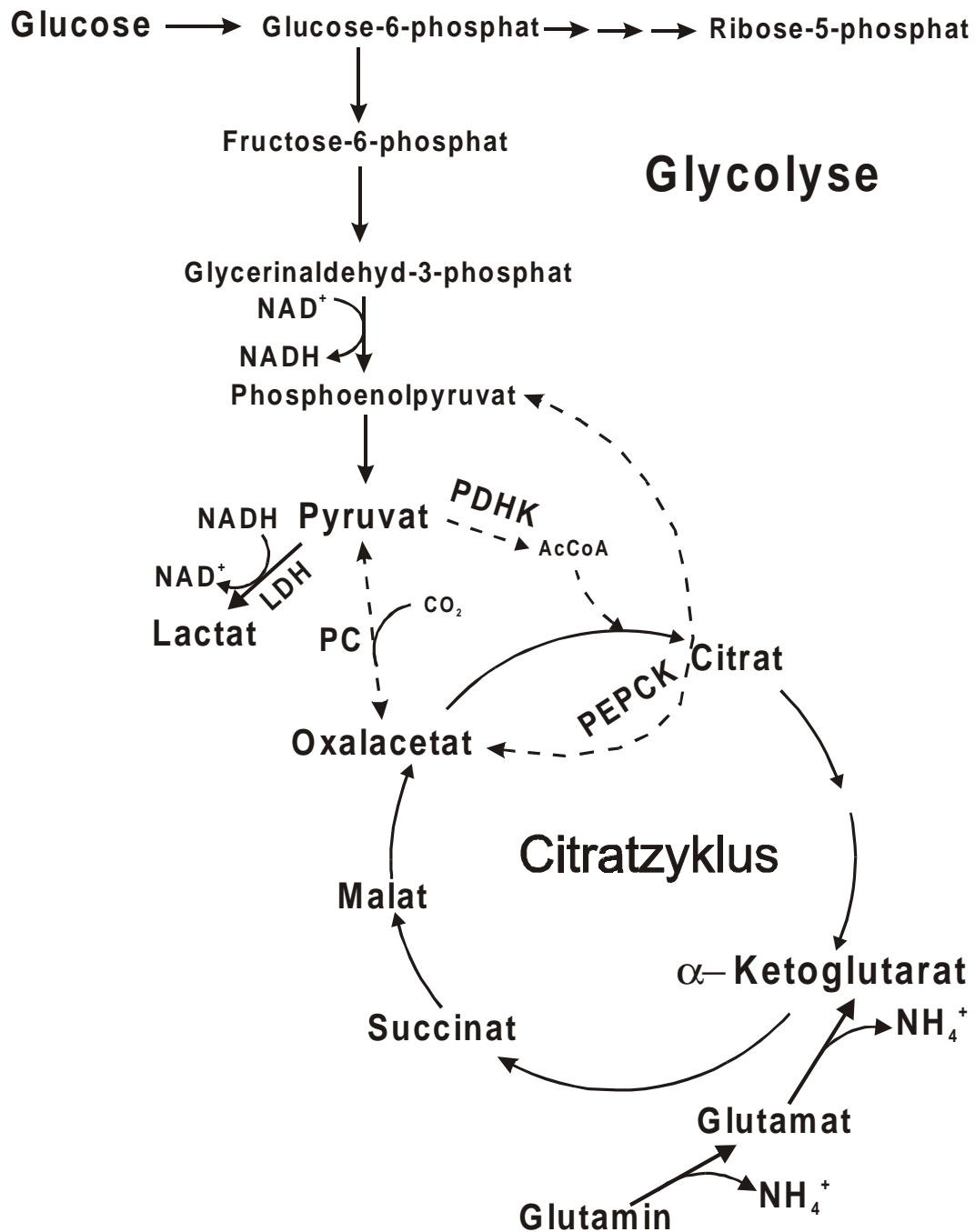


Abb. 1.2.1: Stoffwechselwege von Glucose und Glutamin bei kontinuierlichen Säugetierzelllinien. Die unterbrochenen Linien stellen unterbundene Enzymaktivitäten dar. Modifizierte Darstellung nach Neermann und Wagner, 1996.

vollständige Umsetzung von Glucose zu Lactat haben kontinuierliche Säugerzelllinien mit vielen malignen Tumorzellen gemeinsam (Boxer und Devlin, 1961; McKeehan, 1982; Dietzen und Davis, 1992). Diese Eigenschaft wurde bei Tumorzellen bereits in den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts festgestellt (Warburg, 1930), aber eine eindeutige Erklärung für dieses Phänomen ist bis heute nicht gefunden worden. Anhand von Untersuchungen des Primärmetabolismus von Säugerzelllinien konnte keine Aktivität derjenigen Enzyme festgestellt werden, die die Glycolyse mit dem Citratzyklus verbinden (Fitzpatrick et al., 1993; Petch und Butler, 1994; Neermann und Wagner, 1996; Vriezen und van Dijken, 1998). Diese Enzyme sind der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDHK), die Pyruvat-Carboxylase (PC) und die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) (siehe Abb. 1.2.1). Fitzpatrick et al. (1993) führen die unterbundene Aktivität auf niedrige Expressionsraten der Gene, die diese Enzyme codieren, zurück. Andere Autoren halten hingegen eine irreversible Phosphorylierung durch eine von bestimmten Onkogenen codierte Proteinkinase für die Ursache der nicht vorhandenen Enzymaktivität (Randle et al., 1984; Fiechter und Gmünder, 1989; Murray et al., 1992). Nach Lanks (1986) lenkt ein hoher Quotient von NADH zu NAD⁺ im Cytoplasma von Säugerzelllinien die Lactat-Dehydrogenase-Reaktion in Richtung Lactatproduktion, da bei dieser Enzymreaktion NADH zu NAD⁺ oxidiert wird und auf diese Weise eine Regeneration des in der Glycolyse verbrauchten NAD⁺ stattfindet. Die Ursache für die hohen Konzentrationen von NADH im Cytosol sehen Boxer und Devlin (1961) sowie Perez-Rodriguez et al. (1987) in einem Defekt des Malat-Aspartat-Shuttle-Transporters. Der Malat-Aspartat-Shuttle dient dem Transport von [H] auf der Stufe des NADH vom Cytosol in die Mitochondrien. Perez-Rodriguez et al. (1987) untersuchten diesen Stoffwechselweg in Ehrlich Ascites Tumorzellen und konnten nur geringe Shuttleaktivitäten nachweisen. Die *in vitro*-Aktivität dieses Shuttles konnte von Greenhouse und Lehninger (1976) sowie Lopez-Alarcon und Eboli (1986) gezeigt werden. Hingegen ist die *in vivo*-Aktivität des Shuttles für einen konstanten Shuttleflux zu gering, was auf unzureichende Mengen von Intermediaten des Citratzyklus wie Aspartat zurückgeführt werden kann (Kovacevic, 1972).

Durch die übermäßige Lactatproduktion bei kontinuierlichen Zelllinien und die damit verbundene Ansäuerung des Kulturmediums werden das Wachstum der Zellen inhibiert und die Produktivität der Zellen verringert (Lanks, 1987; Omasa et al., 1992; Goergen et al., 1994; Lao und Toth, 1997). Zudem ist der hauptsächliche Abbau von Glucose über die Glycolyse sehr ineffizient für die Energiegewinnung: Da das entstehende Pyruvat im Cytosol zu Lactat umgesetzt wird, finden seine oxidative Decarboxylierung zu Acetyl-CoA und dessen anschließende Kondensation mit Oxalacetat zu Citrat nicht statt. Als Folge dessen werden pro Mol Glucose nur 2 Mol ATP erzeugt; durch eine vollständige Oxidation von Glucose zu CO_2 und H_2O über den Citratzyklus würden pro Mol Glucose bis zu 36 Mol ATP gewonnen.

Eine weitere Funktion von Glucose innerhalb des Primärmetabolismus von Säugetierzelllinien liegt in der Synthese von Zellbausteinen. So wird ein Teil der Glucose über den Pentosephosphatweg (siehe Abb. 1.2.1) zu Ribose-5-phosphat metabolisiert. Auf diesem Wege entsteht NADPH. Ribose-5-phosphat wird von der Zelle zum Aufbau von RNA und DNA benötigt, NADPH liefert Reduktionsäquivalente bei Biosynthesen (Reitzer et al., 1979 und 1980; Zielke et al., 1984; Karlson, 1988). Der Glucoseflux durch den Pentosephosphatweg ist mit dem glycolytischen Flux gekoppelt: Bei verstärktem glycolytischen Flux wird der Glucoseflux durch den Pentosephosphatweg verringert und umgekehrt kommt es zu einer Steigerung des Glucoseflux über den Pentosephosphatweg bei geringem glycolytischen Flux (Zielke et al., 1978; Reitzer et al., 1979; Glacken, 1988).

1.2.2 Glutaminmetabolismus

Glutamin stellt die Hauptenergiequelle im Primärmetabolismus von Säugetierzelllinien dar. Des Weiteren hat Glutamin eine wichtige Funktion bei der Einstellung des Säure-Base-Gleichgewichts der Zellen und als Aminogruppendonor bei der Synthese von Purinen und Pyrimidinen (McKeehan, 1982; Stryer, 1990).

Durch den Katabolismus des Glutamins, die Glutaminolyse, decken Säugetierzelllinien in der Präsenz von Glucose 30 % bis 65 % ihres Energiebedarfs (Donnelly und

Scheffler, 1976; Zielke et al., 1984; Petch und Butler, 1994). Enthält das Kulturmedium keine Glucose, dann liefert die Glutaminoxidation sogar bis zu 98 % der von der Zelle benötigten Energie (Reitzer et al., 1979). Generell wurde festgestellt, dass die Oxidation des Glutamins umso mehr Energie für Säugerzelllinien liefert, je geringer die Glucosekonzentration im Kulturmedium ist (Reitzer, 1979; O'Rourke und Rider, 1989). Glutamin wird in Säugerzelllinien auf insgesamt acht verschiedenen, teilweise miteinander verknüpften Stoffwechselwegen katabolisiert. Dabei kann Glutamin zu verschiedenen Graden oxidiert werden und daraus resultieren verschiedene Produkte und Energieausbeuten (Zielke et al., 1978 und 1984; Häggström, 1991). Zum Teil wird Glutamin zu Aspartat, Alanin oder Lactat oxidiert. Alanin und Lactat werden in das Kulturmedium sekretiert, Aspartat kann über Oxalacetat in den Citratzyklus eingeschleust werden (Petch und Butler, 1994). Der größte Teil des Glutamins wird deaminiert, wobei α -Ketoglutarat entsteht, welches direkt an den Reaktionen im Citratzyklus teilnehmen kann; auf diesem Weg wird Glutamin vollständig zu CO_2 , H_2O und Ammonium oxidiert (Reitzer et al., 1979; Glacken, 1988). Durch die Deaminierung des Glutamins entstehen pro Mol Glutamin zwei Mol Ammonium. In Tabelle 1.2 sind mögliche Endprodukte der Glutaminolyse und die jeweilige relative molare Ammoniumproduktion dargestellt (Glacken, 1988; Häggström, 1991).

Ammonium entsteht nicht nur als Endprodukt des Glutaminmetabolismus, sondern es wird auch durch den thermischen Zerfall von Glutamin im Kulturmedium freigesetzt (Tritsch und Moore, 1962; Negrotti et al., 1989). Die Halbwertszeit von Glutamin im Kulturmedium beträgt bei 37 °C sieben Tage. Ammonium übt einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum der Zellen aus und wirkt in höheren Konzentrationen toxisch (Lanks, 1987; Glacken, 1988; Newland et al., 1990; Xie und Wang, 1994a und 1994b; Petch und Butler, 1994; Häggström et al., 1996; Lao und Toth, 1997). Für die Wirkungsweise von Ammonium existieren mehrere Theorien und der Mechanismus der inhibitorischen Wirkung von Ammonium konnte nur teilweise aufgeklärt werden.

Tab. 1.2: Energieausbeuten und Ammoniumproduktion durch verschiedene Abbauewege des Glutamins (Glacken, 1988; Häggström, 1991)

Endprodukt	ATP-Produktion (mol/mol Glutamin)	NH ₄ ⁺ -Produktion (mol/mol Glutamin)	ATP/NH ₄ ⁺ (mol/mol)
5 CO ₂	27	2	13,5
Acetyl-CoA	15	2	7,5
Pyruvat	12	2	6
Alanin	9	1	9
Aspartat	9	1	9
Lactat	9	2	4,5

Glacken et al. (1986) und Glacken (1988) erklären den toxischen Effekt von Ammonium mit einer Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes und der daraus resultierenden Zerstörung elektrochemischer Gradienten; die Autoren führen hierbei die eigentliche Wirkung auf Ammoniak, das sich mit Ammonium im Gleichgewicht befindet, zurück. Zudem schreiben sie dem Ammonium einen Einfluss auf den Ablauf von "Futile Cycles" zu. Diese sind energieverbrauchende Stoffwechselzyklen ohne metabolisch nutzbringende Funktionen.

Doyle und Butler (1990) erkennen eine Inhibierung der Glutamat-Dehydrogenase durch Ammonium. Dieses Enzym katalysiert die Bildung von α -Ketoglutarat aus Glutamat; eine Inhibierung des Enzyms führt zur Abnahme von Intermediaten des Citratzyklus und des Citratzyklusflux.

McQueen und Bailey (1991) sowie Ozturk et al. (1992) postulieren wiederum eine Verringerung des intrazellulären pH-Wertes durch Ammonium und eine damit verbundene Störung des Protonengradienten. Andererseits konnten Cherlet und Marc (1998) keine Veränderung des intrazellulären pH-Wertes durch eine Applikation von Ammonium feststellen.

Martinelle et al. (1998) sehen eine der Ursachen der toxischen Wirkung von Ammonium in der Ansäuerung des Cytoplasmas, einer damit verbundenen Änderung der

Aktivität von Ionen transportern und einer dadurch bedingten Zunahme des Energiebedarfs der Zelle. Der Transport von Ammonium in die Zellen wird durch aktiven Transport gewährleistet, an dem ein $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ -Cotransporter beteiligt ist; dieser akzeptiert anstelle von K^+ -Ionen auch NH_4^+ -Ionen (Martinelle und Häggström, 1993; Martinelle et al., 1996; Martinelle et al., 1998). Dadurch erfordert die Aufrechterhaltung von Ionengradienten entlang der Zellmembran eine höhere Aktivität der Na^+K^+ -ATPase und des Na^+/H^+ -Antiports, die Erhaltungsenergie der Zelle nimmt somit zu.

Einen anderen Aspekt der toxischen Wirkung von Ammonium sehen Ryll (1992) und Ryll et al. (1994) in durch Ammonium hervorgerufenen Veränderungen des Nukleotidpools. Die Autoren sehen Ammonium als Baustein für die Synthese der zwei UDP-aktivierten N-acetylierten Hexosamine UDPGalNAc und UDPGlcNAc an, deren Summe als UDPGNac bezeichnet wird. Die Zunahme des UDPGNac-Pools führen die Autoren auf erhöhte Ammoniumkonzentrationen zurück. Dieser Stoffwechselweg

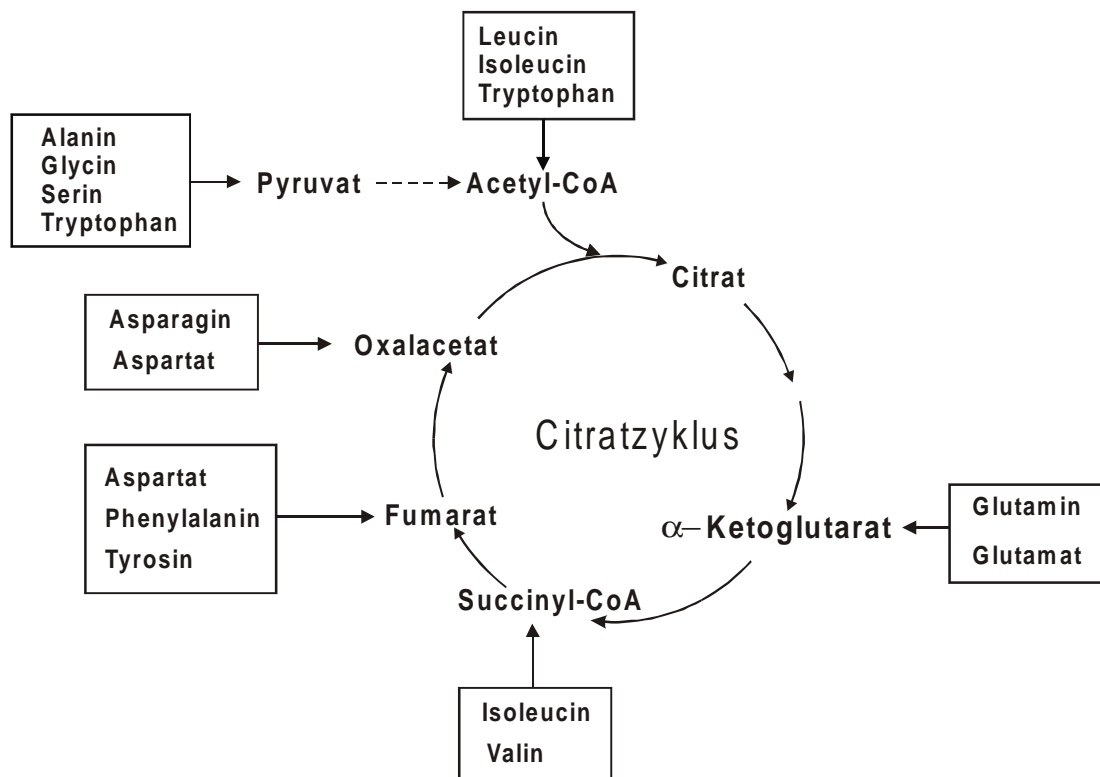


Abb. 1.2.2: Intermediate des Citratzyklus als Abbauprodukte einiger Aminosäuren

wurde von Valley (1996), Valley et al. (1999) sowie Cayli et al. (1999) weiterführend untersucht. Die Autoren konnten experimentell bestätigen, dass UDPGNac aus Glucosamin-6-phosphat entsteht. Als Eingangsreaktion von Ammonium in den Zellmetabolismus erkannten die Autoren die Bildung von Glucosamin-6-phosphat aus Fructose-6-phosphat und Ammonium; diese Reaktion wird von der Glucosamin-6-phosphat-Isomerase katalysiert. Dieses Enzym bewirkt in Primärzellen die entgegengesetzte Reaktion, nämlich den Abbau von Glucosamin-6-phosphat zu Fructose-6-phosphat und Ammonium (Cayli et al., 1999). Bei der Kultivierung kontinuierlicher Säugetierzelllinien ist die Akkumulation von Ammonium im Kulturüberstand jedoch so erheblich, dass die Reaktion der Glucosamin-6-phosphat-Isomerase in Richtung Glucosamin-6-phosphat-Bildung gelenkt wird. Somit trägt dieses Enzym erheblich zum Anstieg des UDPGNac-Pools kontinuierlicher Säugetierzelllinien bei. Cayli et al. (1999) konnten zeigen, dass die Glucosamin-6-phosphat-Isomerase durch Ammonium induziert werden kann.

Glucosamin-6-phosphat kann zudem aus Fructose-6-phosphat und Glutamin gebildet werden; diese Reaktion wird von der Glucosamin-6-phosphat-Synthase katalysiert, die ausschließlich Glutamin als Aminogruppendonor verwendet (Winterburn und Phelps, 1971). Dieses Enzym wird allerdings durch UDPGNac inhibiert (Cayli et al., 1999).

Erhöhte intrazelluläre UDPGNac-Konzentrationen bewirken eine Veränderung der Glycosylierungsmuster vieler Zellproteine (Goochee und Monica, 1990; Gawlitzek et al., 1998; Grammatikos et al., 1998; Valley et al., 1999). UDPGNac kann den Transporter für CMP-aktivierte Sialylsäure (CMP-NeuAc) inhibieren (Pels Rijcken et al., 1995). Dadurch wird der Sialylierungsgrad von Glycoproteinen herabgesetzt und somit deren Funktionalität beeinflusst.

1.2.3 Aminosäurestoffwechsel in kontinuierlichen Säugetierzelllinien

Aminosäuren dienen im Metabolismus kontinuierlicher Säugerzelllinien nicht nur als essentielle Bestandteile bei der Proteinbiosynthese. Ihr Katabolismus führt zur Bildung

von Intermediaten des Citratzyklus, so dass Aminosäuren auch eine Funktion als energieliefernde Substanzen haben.

Abb. 1.2.2 stellt vereinfacht die Verknüpfung einiger Aminosäuren mit dem Citratzyklus dar. So kann Acetyl-CoA aus dem Katabolismus der Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Tryptophan entstehen (Oizumi et al., 1986; Stryer, 1990). Dieser Weg ist bei kontinuierlichen Säugerzellen insbesondere deshalb von Bedeutung, da die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat durch den PDHK unterbunden ist (siehe 1.2.1).

Miller et al. (1989a und 1989b) sowie Kurokawa et al. (1994) beobachteten eine verstärkte Oxidation der verzweigten Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin unter Glucoselimitierung. Bei Fed-Batch-Kultivierungen von Hybridomzellen unter Glutaminlimitierung konnten Ljunggren und Häggström (1992) zeigen, dass der Verbrauch der essentiellen Aminosäuren reduziert wird und ebenso die Produktion der nichtessentiellen Aminosäuren Alanin und Asparagin; diese werden unter Glutaminlimitierung nicht ins Medium ausgeschieden und können von der Zelle zu energieliefernden Intermediaten des Citratzyklus umgewandelt werden (vergleiche Abb. 1.2.2).

1.3 Optimierung von Produktionsprozessen mit kontinuierlichen Säugetierzelllinien durch Metabolic Control und Metabolic Design

Wie bereits in 1.1 dargelegt, sind *Metabolic Control* und *Metabolic Design* Methoden zur Optimierung von Produktionsprozessen mit kontinuierlichen Säugerzelllinien.

Der Begriff *Metabolic Control* bezeichnet die zielgerichtete Kontrolle des Zellmetabolismus durch Veränderung extrazellulärer Parameter. Synonym werden auch die Begriffe *Metabolic Regulation* oder *Metabolic Management* verwendet. Es existieren zwei verschiedene Ansätze: Zum einen wird *Metabolic Control* durch eine gezielte Prozessführung ausgeübt, die durch Dosierung der Substratzufuhr und Abführung von

Produkten eine positive Beeinflussung des Zellmetabolismus bewirken soll. Einer solchen Prozessführung liegen Fluxanalysen und stöchiometrische Berechnungen zugrunde (Xie und Wang, 1994a und 1994b; Zeng und Deckwer, 1995). Zum anderen wird *Metabolic Control* dadurch erzielt, dass dem Kulturmedium Substrate zugegeben werden, die als Effektoren bestimmte Stoffwechselwege einleiten sollen (Kulka und Cohen, 1973; Hugo et al., 1992; Singhvi et al., 1994). Im Folgenden werden einige Ansätze zur Prozessoptimierung durch *Metabolic Control* aufgezeigt.

Glacken et al. (1986), Glacken (1988) sowie Miller et al. (1988; 1989a und 1989b) zeigen die Zusammenhänge von Glycolyse und Glutaminolyse im Primärmetabolismus in einem Netzwerk auf. Daraus entwickelten sie verschiedene Kultivierungsstrategien zur Senkung der Ammoniumproduktion. Sie konnten die Aktivitäten der Aspartat- und Alaninaminotransferase steigern und auf diese Weise die Aktivität der ammoniumproduzierenden Glutamat-Dehydrogenase-Reaktion verringern.

Chang et al. (1995a und 1995b) entwarfen eine elektrokinetische Technik zur kontinuierlichen, selektiven Entfernung von Ammonium und Lactat aus dem Kulturmedium. Dadurch konnten bei einer Hybridomzelllinie das Wachstum um 50 % und die Antikörperproduktion um 100 % gesteigert werden.

Murray et al. (1992 und 1996) strebten einen verstärkten Glucoseflux in den Citratzyklus und einen geringeren Glutaminverbrauch an, indem sie dem Kulturmedium für Hybridomzellen Dichloracetat zusetzten. Dies ist ein potentieller Inhibitor von Transaminasen und ein Aktivator der Pyruvat-Dehydrogenase. Die Autoren konnten durch den Zusatz von Dichloracetat höhere Zellkonzentrationen sowie eine vermehrte Produktion von Antikörpern bei gleichen Glucoseverbrauchsraten und verminderten Glutaminverbrauchsraten erreichen. Neermann (1997) hingegen kann diese Ergebnisse nicht bestätigen. Bei Batchkulturen einer BHK-Zelllinie in mit Dichloracetat supplementiertem Nährmedium wurden geringere Wachstumsraten und niedrigere maximale Zellkonzentrationen als bei der Kontrolle erzielt, welche in Nährmedium ohne Zusatz von Dichloracetat kultiviert wurde. Neermann (1997) konnte keine Aktivierung der Pyruvat-Dehydrogenase durch Dichloracetat feststellen.

Wie am Anfang dieses Kapitels bereits aufgezeigt, bietet das *Metabolic Design*, das synonym auch als *Metabolic Engineering* bezeichnet wird, eine weitere Möglichkeit zur Optimierung von Produktionsprozessen mit kontinuierlichen Säugetierzelllinien (Bailey, 1991; Cameron und Tong, 1993; Stephanopoulos und Sinskey, 1993; Nielsen, 1998). Darunter versteht man eine gezielte genetische Veränderung einer Zelle um einen bestimmten Phänotyp dieser Zelle zu erhalten. Zur Optimierung des Metabolismus von Prokaryonten durch *Metabolic Engineering* sind bereits verschiedene Forschungsarbeiten durchgeführt worden (Ingram et al., 1987; Ohta et al., 1991; Tsai, 1995). Bei kontinuierlichen Säugerzelllinien hat das *Metabolic Engineering* erst in den letzten Jahren sehr stark an Bedeutung gewonnen. So publizierten Pendse und Bailey (1994) die erste Arbeit über *Metabolic Engineering* in Säugerzelllinien. Sie klonierten das Gen für *Vitreoscilla* Hämoglobin (Vhb) in eine CHO-Zelllinie, die Gewebe-Plasminogenaktivator (*Tissue Plasminogen Activator*, tPA) exprimiert. Im Vergleich zur Kontrollzelllinie wurde das Wachstum vermindert, die zellspezifische tPA-Produktion jedoch um 40 % bis 100 % gesteigert.

Renner et al. (1995) klonierten ein für Cyclin E codierendes Gen in CHO K1-Zellen. Cyclin E ist ein den Zellzyklus regulierendes Protein. Durch die Klonierung des Cyclin E-Gens konnte die G1-Phase des Zellzyklus verlängert und die S-Phase verkürzt werden. Somit wurde ein besseres Zellwachstum erreicht.

Lee et al. (1996) konnten ein Wachstum von CHO-Zellen in proteinfreiem Medium erreichen, indem sie die Zellen mit einem für Transkriptionsfaktor E2F-1 codierenden Gen transfizierten.

Singh et al. (1996) erreichten eine höhere Lebendzellkonzentration durch Einbringung des Apoptose-Suppressorproteins bcl-2.

Durch *Metabolic Engineering* wurden ebenfalls Optimierungen der Produktqualität erzielt. Schlenke et al. (1999) klonierten die CMP-NeuAc:Gal(β 1-4)GlcNAc-R α 2,6-Sialyltransferase in eine humanes Erythropoetin exprimierende BHK-21-Zelllinie und konnten dadurch die Sialylierung verbessern.

Im Gegensatz zu den oben angeführten Beispielen sind bislang nur wenige Arbeiten über *Metabolic Engineering* des Primärmetabolismus von Säugerzelllinien ausgeführt

worden. Stephanopoulos und Vallino (1991) sehen im Primärmetabolismus ein rigides Netzwerk von Reaktionen, das aufgrund seiner Komplexität kaum manipulierbar ist. Im Folgenden werden einige der wenigen publizierten Forschungsarbeiten über *Metabolic Engineering* des Primärmetabolismus aufgeführt und erläutert.

Bell et al. (1995) transfizierten eine Hybridomzelllinie mit einem Vektor, der das Gen für die Glutaminsynthetase trägt. Dadurch konnte die transfizierte Zelllinie in glutaminfreiem Medium wachsen; auf diese Weise wurde das Problem der Ammoniumtoxizität (siehe 1.2.2) stark verringert. Diese Arbeit stellt einen wichtigen Eingriff in den Primär- und Energiemetabolismus von kontinuierlichen Säugerzellen dar.

Rees und Hay (1995) klonierten den vollständigen prokaryontischen Biosyntheseweg für Threonin aus Aspartat in eine Säugertumorzelllinie, so dass ein Wachstum dieser Zelllinie in threoninfreiem Medium möglich war. Die Zelllinie wurde mit zwei Vektoren transfiziert, die die Gene für Aspartokinase, Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase und Threonin-Synthetase enthielten. Durch die Expression dieser Gene wies die Zelllinie in threoninfreiem Medium das gleiche Wachstumsverhalten auf wie die nicht transfizierte Zelllinie in threoninhaltigem Medium. Mit diesem *Metabolic Engineering* Ansatz können Medienkosten eingespart werden, da die vergleichsweise teure Aminosäure Threonin nicht mehr essentiell für die Zelllinie ist.

Ein Eingriff in den Glucosemetabolismus wurde erstmals von Neermann (1997) vorgenommen. Der Autor erkannte durch Analyse des Energiestoffwechsels die Hexokinasereaktion als den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Glycolyse. Durch Transfektion einer BHK-Zelllinie mit der low- K_M -Hexokinase I aus Rattenhirn konnte er im Vergleich zur nicht transfizierten Wildtyp-Zelllinie den glycolytischen Flux erhöhen. Auf diese Weise stieg der ATP-Pool auf das Dreifache an und dadurch wurde die Produktion des Modellproteins β -Galactosidase erhöht. Jedoch nahm die Lactatproduktion ebenfalls zu und das Zellwachstum ab. Die Reduktion des Wachstums konnte auf eine Verringerung des Flux durch den Pentosephosphatweg zurückgeführt werden, da dieser mit dem Glycolyseflux gekoppelt ist (siehe 1.2.1). Neermann (1997) konnte experimentell bestätigen, dass der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex,

die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase und die Pyruvat-Carboxylase inaktiv sind und somit keine enzymatische Verbindung zwischen Glycolyse und Citratzyklus besteht. Dadurch nimmt aufgrund des erhöhten glycolytischen Flux die Lactatproduktion zu, da keine Decarboxylierung des Pyruvat im Mitochondrium stattfindet und durch die Lactat-Dehydrogenase-Reaktion das für die Glycolyse benötigte NAD^+ regeneriert werden kann.

Wie bereits oben beschrieben, erkannten Valley et al. (1999) die Reaktion der Glucosamin-6-phosphat-Isomerase als Eingangsreaktion von Ammonium in den Stoffwechselweg, der zur Bildung von UDPGNac führt. Cayli et al. (1999) exprimierten in einer BHK-21-Zelllinie Glucosamin-6-phosphat-Isomerase codierende cDNA in antisense-Orientierung. Dadurch erreichten sie eine Reduktion der Aktivität dieses Enzyms um 65 % sowie eine Verringerung des intrazellulären UDPGNac-Pools um 50 %. Allerdings war die Expression der antisense-cDNA in der transfizierten BHK-Zelllinie nicht stabil.

Park et al. (2000) konnten durch Eingriff in den Harnstoffzyklus bei CHO-Zellen die Ammoniumproduktion verringern und das Zellwachstum verbessern. Sie klonierten zwei am Harnstoffzyklus beteiligte Enzyme, die Carbamoylphosphat-Synthetase und die Ornithin-Transcarbamoylase, in CHO-Zellen. Die erfolgreich transfizierten Zellen produzierten im Vergleich zum nicht transfizierten Wildtyp bis zu 33 % weniger Ammonium und zeigten ein bis zu 30 % schnelleres Wachstum.

Eine entscheidende Arbeit auf dem Gebiet des *Metabolic Engineering* wurde von Irani et al. (1999) durchgeführt. Die Autoren konstruierten einen Vektor mit dem Gen für die Pyruvat-Carboxylase 2 (PYC2) aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Diese Hefe-Pyruvat-Carboxylase ist im Gegensatz zu Säugerzelllinien, wo sie sich in den Mitochondrien befindet, im Cytoplasma lokalisiert. Auf diese Weise kann Pyruvat durch die PYC2 zu Oxalacetat carboxyliert werden. Durch die Malat-Dehydrogenase wird Oxalacetat zu Malat reduziert, wobei gleichzeitig NADH zu NAD^+ oxidiert wird. Malat kann durch den Malat-Aspartat-Shuttle in das Mitochondrium gelangen und am Citratzyklus teilnehmen. So wird Pyruvat in das Mitochondrium kanalisiert, so dass die Lactat-Dehydrogenase-Reaktion vermindert wird. Außerdem wird durch die Reaktion

der Malat-Dehydrogenase das in der Glycolyse verbrauchte NAD^+ regeneriert. Durch die Transfektion einer BHK-Zelllinie mit der PYC2 konnten die Autoren bei den transfizierten Zellen im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen vierfach geringere Glucoseverbrauchsrate und um den Faktor 2,7 niedrigere Lactatbildungsrate erreichen. Die Glutaminverbrauchsrate war bei den transfizierten Zellen um die Hälfte geringer als diejenige der nicht transfizierten Zellen. Die Produktion des Modellproteins humanes Erythropoetin (rhuEPO) konnte bei kontinuierlicher Kultivierung unter Substratlimitierung gesteigert werden (Irani, 2000).

Die oben beschriebene Strategie der Einführung einer rekombinanten Pyruvat-Carboxylase zur Optimierung des Energiemetabolismus soll im folgenden Kapitel näher erläutert werden.

1.4 Strategie zur Optimierung des Primärmetabolismus von Säugerzelllinien durch Einführung einer rekombinanten cytosolischen Pyruvat-Carboxylase

Wie bereits in Kapitel 1.2.1 beschrieben und in Abb. 1.2.1 dargestellt, sind bei Säugerzelllinien die enzymatischen Verbindungen zwischen Glycolyse und Citratzyklus unterbunden, so dass Pyruvat im Cytosol über die Lactat-Dehydrogenase zu Lactat reduziert wird. Auf diese Weise wird das in der Glycolyse verbrauchte NAD^+ regeneriert. In Normalzellen wird Pyruvat im Mitochondrium durch den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDHK) oxidativ zu Acetyl-CoA decarboxyliert. Dieser Enzymkomplex setzt sich aus drei Enzymen und 60 verschiedenen Untereinheiten zusammen (Reed et al., 1985). Eine Klonierung des PDHK in Säugetierzelllinien ist nicht sinnvoll, da viele verschiedene Gene zur Transfektion erforderlich wären. Zudem ist der PDHK im Mitochondrium lokalisiert. Somit wäre nach der Expression der den PDHK codierenden Gene im Cytosol die Fusion einer Signalsequenz für den Transport ins Mitochondrium erforderlich; aufgrund dessen ist eine Klonierung des PDHK in

Säugerzelllinien nahezu unmöglich.

Ein weiteres Verbindungsenzym zwischen Glycolyse und Citratzyklus ist die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (vergleiche Abb. 1.2.1). Dieses Enzym katalysiert eine Schlüsselreaktion der Gluconeogenese, nämlich die Umwandlung von Oxalacetat zu Phosphoenolpyruvat. Zum Ablauf dieser Reaktion ist die Dephosphorylierung eines GTP zu GDP erforderlich, so dass ein umgekehrter Ablauf dieser Reaktion die Bereitstellung von Energie erfordern würde. Damit ist die Klonierung der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase in Säugerzelllinien zur Optimierung des Primärmetabolismus nicht geeignet.

Hefen besitzen im Gegensatz zu Säugerzellen eine im Cytosol lokalisierte Pyruvat-Carboxylase (PYC, siehe 1.5). Durch die Klonierung der PYC in Säugerzelllinien entfallen die Probleme der Klonierung eines mitochondrialen Proteins (siehe oben). In Abb. 1.4.1 ist die Strategie zur Einführung einer cytosolischen Pyruvat-Carboxylase in Säugetierzelllinien schematisch dargestellt. Abb. 1.4.1 A zeigt den Primärmetabolismus vor der Einführung der PYC2, Abb. 1.4.1 B gibt die Veränderungen des Primärmetabolismus nach Einführung der PYC2 wieder. Die Expression der PYC2 im Cytosol führt zur Carboxylierung von Pyruvat zu Oxalacetat, das von der Malat-Dehydrogenase zu Malat reduziert wird. Bei dieser Reaktion wird NADH zu NAD⁺ oxidiert, so dass hier das in der Glycolyse verbrauchte NAD⁺ regeneriert werden kann. Die Reaktion der Malat-Dehydrogenase stellt folglich eine Konkurrenzreaktion zur Lactat-Dehydrogenase-Reaktion dar, da diese ebenfalls NADH als Cosubstrat benötigt. Malat gelangt durch den Malat-Aspartat-Shuttle in das Mitochondrium und kann am Citratzyklus teilnehmen. Des Weiteren kann Malat vom Malat-Enzym zu Pyruvat umgewandelt werden. Auf diesem Wege wird NADP⁺ zu NADPH reduziert, welches die Zelle für reduktive Biosyntheseprozesse benötigt (MacDonald, 1995).

Bei der Klonierung einer cytosolischen Hefe-Pyruvat-Carboxylase in Säugetierzellen beruht das *Metabolic Engineering* nicht auf einer Erhöhung der Enzymdosis eines bereits vorhandenen Stoffwechselweges wie bei der Klonierung der low-K_M-Hexokinase I (Neermann, 1997). Säugetierzellen besitzen keine cytosolische Pyruvat-Carboxylase. Somit wird ein für Mammaliazellen neuartiger Stoffwechselweg generiert.

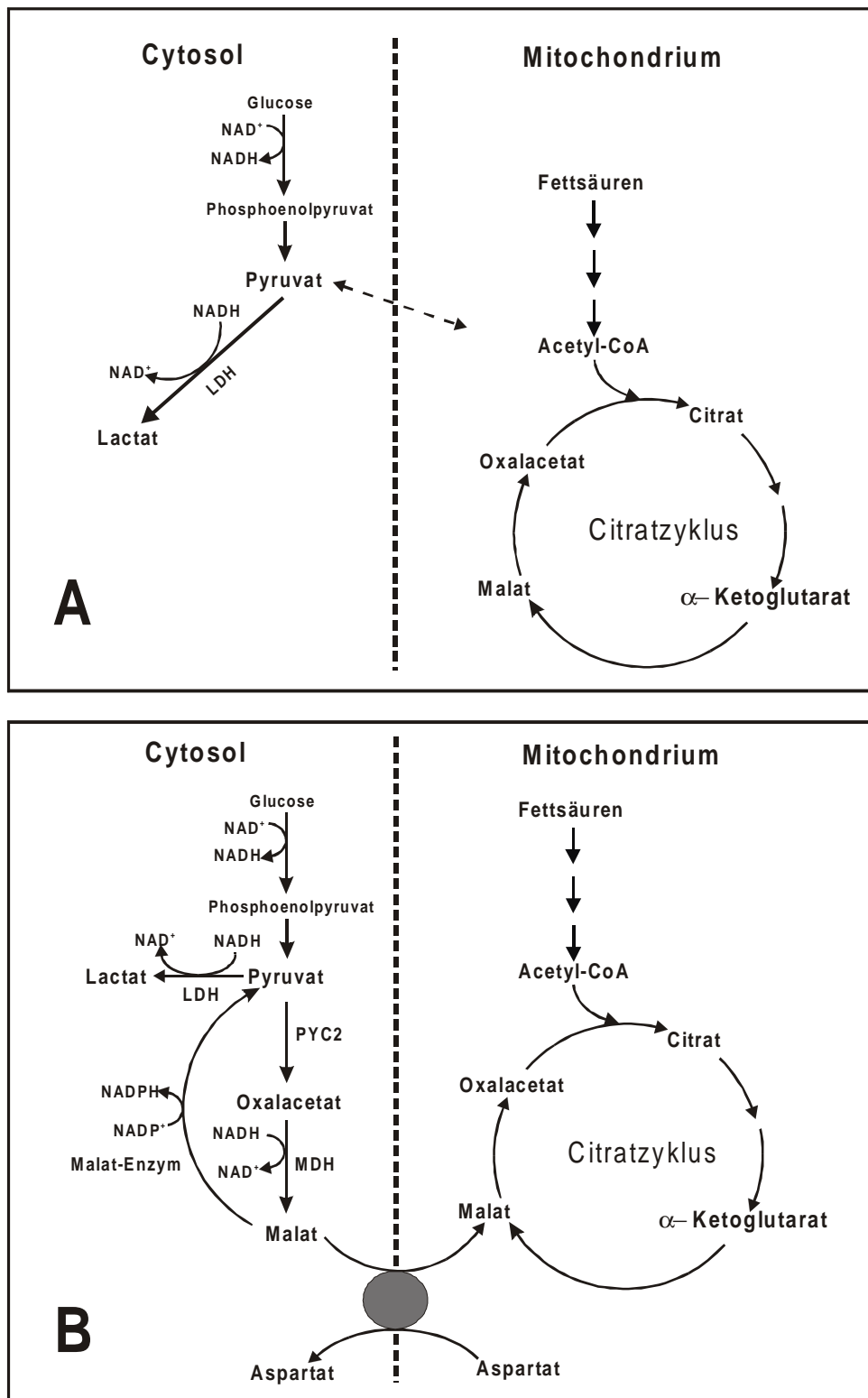


Abb. 1.4.1: Strategie zur Optimierung des Primärmetabolismus durch Einführung einer cytosolischen Pyruvat-Carboxylase (PYC2)

1.5 Charakteristik der Pyruvat-Carboxylase aus Hefe

Im Gegensatz zur Pyruvat-Carboxylase in Mammaliazellen (PC), die mitochondrial lokalisiert ist, befindet sich die Pyruvat-Carboxylase der Hefen (PYC) im Cytosol (Osmani et al., 1985; Walker et al., 1991). Die cytosolische Hefe-Pyruvat-Carboxylase ist von Acetyl-CoA als Aktivator unabhängig. Hier liegt der entscheidende Unterschied zur Pyruvat-Carboxylase aus Säugerzellen, die Acetyl-CoA als Aktivator benötigt. Die Pyruvat-Carboxylase katalysiert die folgende Reaktion:

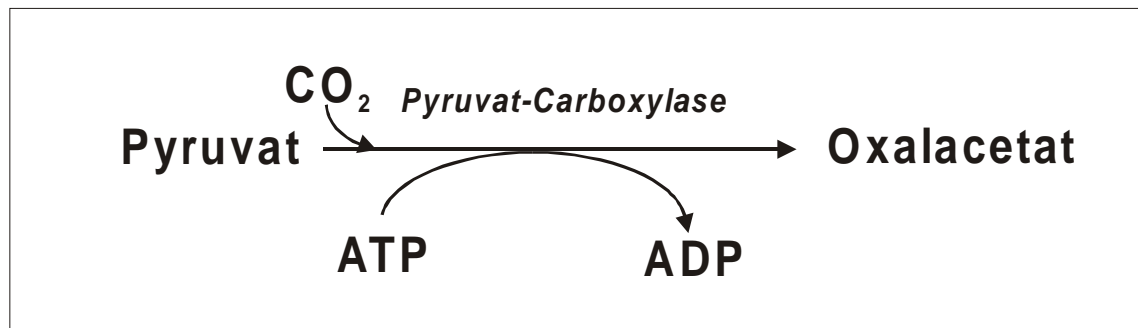


Abb. 1.5.1: Reaktion der Pyruvat-Carboxylase

Die Pyruvat-Carboxylase aus verschiedenen Spezies weist neben Unterschieden auch einige Gemeinsamkeiten auf. Sie ist ein tetrameres Enzym aus vier identischen biotinylierten Untereinheiten (Goss et al., 1979; Osmani et al., 1985). Das Molekulargewicht einer dieser Untereinheiten beträgt in Säugerzellen 120 kDa bis 130 kDa (Utter et al., 1975), in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* 120 kDa bis 125 kDa (Brewster et al., 1994). In *Saccharomyces cerevisiae* kommen zwei verschiedene Isoformen der Pyruvat-Carboxylase vor, die als PYC1 und PYC2 bezeichnet werden (Brewster et al., 1994; Stucka et al., 1991). In Tabelle 1.5 werden einige Eigenschaften der Pyruvat-Carboxylasen aus Säugerzellen und aus *Saccharomyces cerevisiae* vergleichend gegenübergestellt.

Tab. 1.5: Eigenschaften der Pyruvat-Carboxylasen aus Säugerzellen und der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Keech und Utter, 1963; Ruiz-Amil et al., 1965; Mildvan et al., 1966; Cazzulo und Stoppani, 1967; Scrutton et al., 1969; Utter et al., 1975; Wood und Barden, 1977; Osmani et al., 1985; Stucka et al., 1991)

	PC aus Säugerzellen	PYC1 aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PYC2 aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Lokalisation in der Zelle	Mitochondrium	Cytosol	Cytosol
Molekulargewicht einer Untereinheit [kDa]	120-130	120-125	120-125
K_M für Pyruvat [mM]	0,44	0,8 / 0,45	0,31
Aktivatoren	Acetyl-CoA (K _A = 2 µM) Propionyl-CoA (K _A = 14 µM) n-Butyryl-CoA (K _A = 75 µM)	Acetyl-CoA (K _A = 92 µM) Palmitoyl-CoA (K _A = 0,2 µM) Stearoyl-CoA (K _A = 0,7 µM)	Acetyl-CoA (K _A = 92 µM) Palmitoyl-CoA (K _A = 0,2 µM) Stearoyl-CoA (K _A = 0,7 µM)
Aktivität ohne Aktivator	nicht aktiv	aktiv	aktiv
Inhibitoren	Avidin L-Glutamat α-Ketoglutarat	Avidin L-Aspartat β-Ketoglutarat	Avidin L-Aspartat β-Ketoglutarat

Die Funktion von PYC1 liegt in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* hauptsächlich in der Einleitung der Gluconeogenese. Die Funktion von PYC2 ist hingegen noch nicht eindeutig geklärt (Brewster et al., 1994).

Für das Einbringen in Säugerzelllinien ist die PYC2 aufgrund ihres K_M für Pyruvat der PYC1 vorzuziehen: Die Michaelis-Konstante beträgt im Falle der PYC2 0,31 mM, bei der PYC1 liegt sie bei 0,45 mM (Stucka et al., 1991). Ruiz-Amil et al. (1965) und

Scrutton et al. (1969) geben mit 0,8 mM sogar einen noch höheren K_M -Wert für PYC1 an. Irani et al. (1999) führten ein *Metabolic Engineering* mit einer BHK-Zelle durch, indem sie die PYC2 in eine BHK-Zelle klonierten (siehe 1.3).

1.6 Amplifikation von Genen in CHO-Zellen

Aus Ovarzellen eines chinesischen Hamsters (*Cricetus griseus*) wurde im Jahre 1957 die kontinuierliche Zelllinie CHO K1 hergestellt (Kao und Puck, 1968; Puck, 1985). Aufgrund eines Stoffwechseldefektes benötigt diese Zelllinie Prolin zum Wachstum (Ibelgauffs, 1993). Von dieser Zelllinie sind einige Subzelllinien hergestellt worden. 1980 generierten Urlaub und Chasin eine CHO-Zelllinie durch Mutagenese aus der Zelllinie CHO K1 (Urlaub und Chasin, 1980). Sie führten in eines der beiden Allele, die das Enzym Dihydrofolat-Reductase (DHFR) codieren, eine Punktmutation ein und entfernten das andere Allel irreversibel, so dass die Zelllinie keine Dihydrofolat-Reductase exprimieren kann. Diese Zelllinie wird als CHO DX B11 bezeichnet (Graf und Chasin, 1982); Synonyme für diese Zelllinie sind DUK-XB11 und DUKX (Prof. Dr. Lawrence Chasin, Columbia University, New York, NY, USA, persönliche Mitteilung).

Durch die Mutagenese einer weiteren CHO-Wildtypzelllinie, die den Namen CHOpro3- oder "CHO Toronto" trägt (Flintoff et al., 1976; Flintoff et al., 1982) ist mittels Inaktivierung beider Allele für Dihydrofolat-Reductase eine Zelllinie entstanden, die als CHO DG44 bezeichnet wird (Prof. Dr. Lawrence Chasin, Columbia University, New York, NY, USA, persönliche Mitteilung; Urlaub et al., 1983; Urlaub et al., 1986).

In Abb. 1.6.1 wird die Funktion des Enzyms Dihydrofolat-Reductase veranschaulichend dargestellt.

Die Dihydrofolat-Reductase katalysiert die Reduktion von Dihydrofolat zu Tetrahydrofolat. Dieses Molekül ist ein Grundbaustein für die Synthese von Purinen (Stryer, 1990). Außerdem wird es für die Synthese der Aminosäure Glycin aus Serin benötigt und ist als Methylgruppen-Donor Cosubstrat für die Thymidylat-Synthetase. Diese katalysiert die Neusynthese von Thymidinmonophosphat (TMP) aus Desoxyuridin-

monophosphat (dUMP). Die Inaktivierung der Dihydrofolat-Reductase führt zu einem starken Anstieg der intrazellulären Konzentration von dUTP und einem gleichzeitigen Abfall des TTP-Pools. Demzufolge werden häufig Uracil-Reste in die DNA eingebaut und die DNA wird fragmentiert, da die Reparaturenzyme die zahlreichen Basenfehlpaarungen nicht mehr beheben können (Ibelgaufts, 1993). DHFR-negative Zellen sind auf einen Zusatz von Nucleosiden im Medium angewiesen, ebenso auf die Aminosäure Glycin.

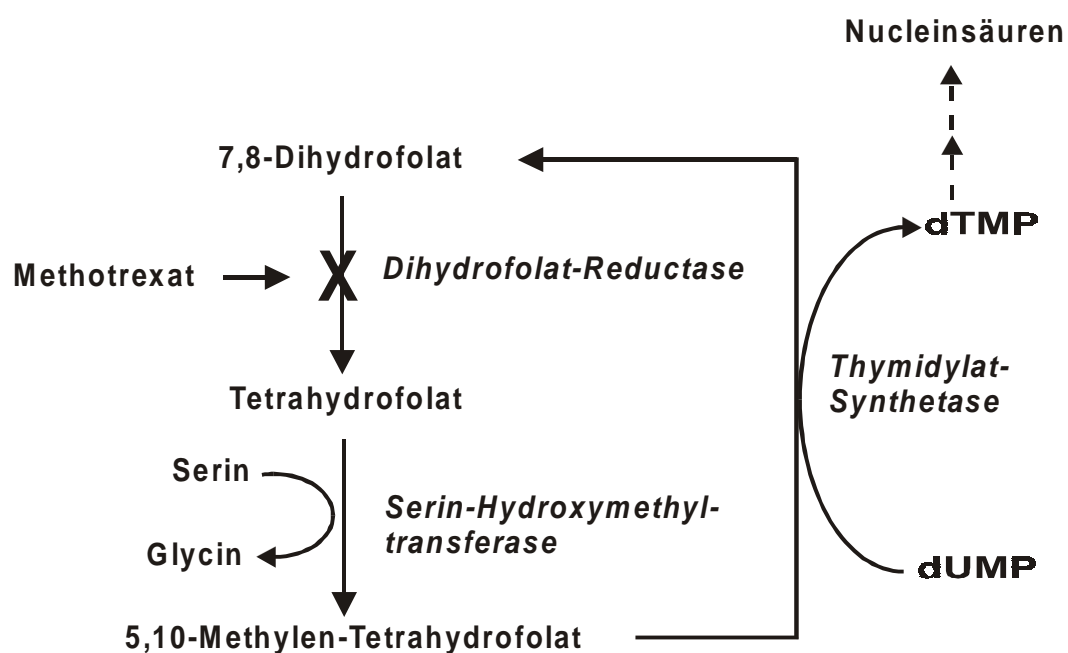


Abb. 1.6.1: Funktion der Dihydrofolat-Reductase im Nucleotidstoffwechsel (modifiziert nach Ibelgaufts, 1993)

Die Dihydrofolat-Reductase wird durch Methotrexat (MTX) inhibiert (Camargo und Cervenka, 1980). Wird eine DHFR-negative Zelllinie wie CHO DG44 mit einem Transfergen und einem Gen für Dihydrofolat-Reductase cotransfiziert, kann durch schrittweise Zugabe von Methotrexat zum Kulturmedium eine Methotrexatresistenz erreicht werden. Diese beruht auf der Erhöhung der Kopienzahl des für DHFR codierenden Gens. Auf diese Weise ist es auch möglich, das cotransfizierte Transfergen

mit zu amplifizieren (Ringold et al., 1981; Kaufman und Sharp, 1982; Wurm et al., 1986; Wurm et al., 1992). So können bis zu tausend Kopien dieses Gens pro Zelle entstehen (Nunberg et al., 1978; Goeddel et al., 1983; Milbrandt et al., 1983; Kaufman et al., 1985; Capon et al., 1989) und durch Amplifikation in DHFR-negativen CHO-Zelllinien hohe Produktausbeuten erzielt werden.

Bei der Zelllinie CHO DX B11 besteht allerdings die Möglichkeit der Reversion in dem durch die Punktmutation modifizierten Allel; diese Reversion kann in einer Frequenz von $1:10^8$ stattfinden (Prof. Dr. Lawrence Chasin, Columbia University, New York, NY, USA, persönliche Mitteilung). Somit wird CHO DG44 bevorzugt verwendet, da im Gegensatz zu DX B11 beide für DHFR codierenden Allele irreversibel entfernt wurden (Urlaub et al., 1983) und deshalb die Expression endogener DHFR ausgeschlossen werden kann. CHO DG44 gehört zu den wichtigsten Produktionszelllinien in der pharmazeutischen Industrie.

1.7 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben wurde, sind zur Optimierung von Produktionsprozessen mit kontinuierlichen Säugetierzelllinien bereits zahlreiche Fortschritte durch Verbesserung der Reaktorsysteme und Entwicklung von Kulturmedien erzielt worden. Die Wirtschaftlichkeit von Produktionsprozessen wird jedoch durch die Ineffektivität des Primärstoffwechsels von Säugetierzelllinien stark vermindert. Untersuchungen des Primärmetabolismus führten zu der Erkenntnis, dass die enzymatische Verbindung zwischen Glycolyse und Citratzyklus unterbunden ist. Irani et al. (1999) klonierten erfolgreich die PYC2 aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* in eine BHK-21-Zelllinie und ermöglichten auf diese Weise die Einschleusung von Glucosekohlenstoff in den Citratzyklus.

Im Gegensatz zu BHK-Zellen ist mit den Zelllinien CHO DX B11 und CHO DG44 die Amplifikation rekombinanter Gene möglich, da sie keine Dihydrofolat-Reductase exprimieren (siehe 1.6); durch Cotransfektion der Dihydrofolat-Reductase mit einem Transfergen können mit diesen Zelllinien sehr hohe Produktausbeuten erzielt werden

(siehe 1.6). Die derzeit wichtigste Produktionszelllinie der pharmazeutischen Industrie ist CHO DG44, da bei dieser Zelllinie im Gegensatz zu CHO DX B11 die Expression endogener DHFR unterbunden ist (siehe 1.6).

Auf Basis der Resultate von Irani et al. (1999) und Irani (2000) soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob durch die Klonierung der cytosolischen Hefe-Pyruvat-Carboxylase PYC2 in die industriell verwendete Produktionszelllinie CHO DG44 die Effizienzsteigerung des Primärmetabolismus dieser Zelllinie möglich ist. Die vorliegende Arbeit ist ein gemeinsames Projekt der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) und Novo Nordisk A/S, Gentofte, Dänemark.

Anhand der Resultate soll ein Vergleich der Klonierung von PYC2 in CHO DG44 mit der Klonierung von PYC2 in BHK-21 (Irani et al., 1999) stattfinden. CHO- und BHK-Zellen unterscheiden sich bezüglich ihrer Substratverbrauchs- und Lactatproduktionsraten. Neermann (1997) ermittelte Glucoseverbrauchs- und Lactatproduktionsraten der Wildtypzelllinie CHO K1; sie waren um den Faktor 1,3 geringer als diejenigen der Wildtypzelllinie BHK-21 A. Daher soll in der vorliegenden Arbeit auch der Energiemetabolismus der nicht mit dem PYC2-Gen transfizierten Wildtypzelllinie CHO DG44 analysiert werden. Durch den anschließenden Vergleich mit der nicht mit dem PYC2-Gen transfizierten Wildtypzelllinie BHK-21 soll eine Bewertung des Effekts der rekombinanten PYC2 stattfinden. Somit soll geprüft werden, ob die Strategie der PYC2-Klonierung bei verschiedenen Zelllinien zu einer Verbesserung des Energiestoffwechsels führt und generalisiert werden kann.

Durch Analyse des Energiestoffwechsels soll festgestellt werden, ob durch die Einführung der PYC2 eine Verringerung der Verbrauchsraten der Substrate Glucose und Glutamin möglich ist und zudem die Lactatproduktion reduziert werden kann. Des Weiteren wird der Einfluss der PYC2 auf die Wachstumsrate der Zellen und die maximale Zellkonzentration untersucht. Zunächst soll dabei eine Cotransfektion des PYC2-Gens mit dem Resistenzgen für das Antibiotikum Geneticin (G418) erfolgen; auf diese Weise bleibt die Möglichkeit, die rekombinante CHO-Zelllinie erneut mit DHFR und einem Modellprotein zu transfizieren und das Modellprotein zu amplifizieren.

Ein weiteres Ziel dieses *Metabolic-Engineering*-Ansatzes ist die Optimierung der Produktion eines Modellproteins mit der Zelllinie CHO DG44. Es soll ein bicistronisches Plasmid konstruiert werden, das die Gene für das Modellprotein und die PYC2 trägt. Durch Transfektion mit diesem Plasmid und anschließende Amplifikation der darauf enthaltenen Gene wird der Einfluss der PYC2 auf die Produktivität untersucht. Als Modellprotein wird Human Growth Hormone (HGH) gewählt. Human Growth Hormone ist ein Polypeptidhormon mit einer Molmasse von 22 kd. Es besteht aus 191 Aminosäuren (Denoto et al., 1981). Die Analytik dieses Modellproteins ist unkompliziert und gut etabliert: Rekombinantes HGH wird von Säugetierzellen in den Kulturüberstand sekretiert und kann durch einen kommerziell erhältlichen *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) quantifiziert werden.

Durch Cotransfektion von CHO DG44 mit dem bicistronischen Plasmid und der DHFR besteht die Möglichkeit sowohl das Modellprotein als auch die PYC2 zu amplifizieren. Als Kontrolle dient hierbei eine CHO DG44-Zelllinie, die mit einem bicistronischen Plasmid gleicher Größe transfiziert wurde. Dieses Plasmid trägt ebenfalls das Gen für HGH. Das PYC2 codierende Gen ist hierbei jedoch in umgekehrter Richtung eingebaut worden, so dass eine Expression der PYC2 nicht möglich ist.

Durch die gemeinsame Amplifikation von HGH und PYC2 soll eine hohe Produktion von Human Growth Hormone gewährleistet und zudem der Energiestoffwechsel der Zellen verbessert werden. Die angestrebte Optimierung der Produktion von HGH wird demzufolge zum einen durch die Erhöhung der Kopienzahl des HGH-Gens erreicht und zum anderen durch den effizienteren Energiestoffwechsel der Zelle.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkulturtechniken

2.1.1 Zellen

2.1.1.1 Säugerzelllinien

2.1.1.1.1 CHO DG44/D3

CHO-Zelllinien stammen aus epithelartigen Eierstockzellen des chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*). Die Zelllinie CHO DG44 wurde aus der Zelllinie CHOpro3- (Flintoff et al., 1976; Flintoff et al., 1982) durch irreversible Entfernung beider für Dihydrofolat-Reductase codierenden Allele entwickelt (Urlaub et al., 1983) (vergleiche 1.6). Der Subklon CHO DG44/D3 wurde von der Firma Novo Nordisk A/S (Kopenhagen, Dänemark) zur Verfügung gestellt.

2.1.1.1.2 CHO DG44/D3 PYC2-Klone

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die rekombinanten Zelllinien CHO DG44/D3 PYC2-B2, CHO DG44/D3 PYC2-F3 und CHO DG44/D3 PYC2-G2 hergestellt. Diese Zelllinien sind Subklone, die aus der Cotransfektion der Zelllinie CHO DG44/D3 mit den Plasmiden pCMVSHE-PYC2 und pAG60 hervorgegangen sind. Das Plasmid pCMVSHE-PYC2 trägt das Gen für die Pyruvat-Carboxylase 2 (PYC2) aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Irani et al., 1999). pAG60 (Colbère et al., 1981) enthält das Resistenzgen gegen das Antibiotikum Geneticin (G418). Durch die Expression dieses Gens weisen die oben angeführten Zelllinien Resistenz gegen Geneticin bis zu einer Konzentration von 600 $\mu\text{g l}^{-1}$ Geneticin auf.

2.1.1.1.3 CHO DG44/D3 pAG-MK

Die rekombinante Zelllinie CHO DG44/D3 pAG-MK wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Sie ist eine Mischung mehrerer Einzelklone, die aus der Transfektion der Zelllinie CHO DG44/D3 mit dem Plasmid pAG60 (siehe 2.1.1.2) hervorgegangen ist. Die Zelllinie weist eine Geneticinresistenz bis zu einer Konzentration von 600 $\mu\text{g l}^{-1}$ Geneticin auf.

CHO DG44/D3 pAG-MK exprimiert wie der Wildtyp CHO DG44/D3 keine PYC2, wächst jedoch im gleichen Kulturmedium wie die unter 2.1.1.1.2 angeführten PYC2-Klone. Somit dient sie als Kontrolle bei vergleichenden Experimenten mit PYC2-Klonen.

2.1.1.1.4 CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK

Die rekombinante Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Diese Zelllinie ist eine Mischung aus mehreren Einzelklonen, die aus der Cotransfektion der Zelllinie CHO DG44/D3 mit den Plasmiden pSBC-1/2-HGH/PYC2 (siehe 3.2) und pAdD26SV(A)-3 (siehe 2.1.1.2.4) hervorgegangen ist. Das Plasmid pSBC-1/2-HGH/PYC2 wurde vom Autor konstruiert. Es trägt die Gene für Human Growth Hormone (HGH) und Pyruvat-Carboxylase 2 (PYC2) aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die Zelllinie weist eine Methotrexatresistenz bis zu einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ Methotrexat auf.

2.1.1.1.5 CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK

Die rekombinante Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Diese Zelllinie ist eine Mischung aus mehreren Einzelklonen, die aus der Cotransfektion der Zelllinie CHO DG44/D3 mit den Plasmiden pSBC-1/2-HGH/PYC2wd (siehe 3.2) und pAdD26SV(A)-3 (siehe 2.1.1.2.4) hervorgegangen ist. Das Plasmid pSBC-1/2-HGH/PYC2wd wurde vom Autor konstruiert. Es trägt das Gen für Human Growth Hormone (HGH) und zudem in umgekehrter Orientierung das für Pyruvat-Carboxylase 2 (PYC2) aus *Saccharomyces cerevisiae* codierende Gen. Die Zelllinie weist eine Methotrexatresistenz bis zu einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ Methotrexat auf.

2.1.1.2 Prokaryonten

2.1.1.2.1 *Escherichia coli* TG1

Der *E. coli*-Stamm TG1 wurde von Dr. Manfred Wirth (Abteilung Regulation und Differenzierung, GBF, Braunschweig) zur Verfügung gestellt.

2.1.1.2.2 *Escherichia coli* TG1 PYC2

Der transformierte *E. coli*-Stamm TG1 PYC2 wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Er enthält das Plasmid pCMVSHE-PYC2 mit dem für die Pyruvat-Carboxylase 2 aus *Saccharomyces cerevisiae* codierenden Gen. Aufgrund dieses Plasmids weist der Stamm Ampicillinresistenz auf.

2.1.1.2.3 *Escherichia coli* Top 10

Der *E. coli*-Stamm Top 10 wurde von Dr. Joop van den Heuvel (Arbeitsgruppe Mikrobielle Systeme, GBF, Braunschweig) zur Verfügung gestellt.

2.1.1.2.4 *Escherichia coli* Top 10 pAdD26SV(A)-3

Der transformierte *E. coli*-Stamm Top 10 pAdD26SV(A)-3 wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Er enthält das Plasmid pAdD26SV(A)-3 mit dem für Dihydrofolat-Reductase codierenden Gen (Kaufman und Sharp, 1982). Der Stamm weist aufgrund dieses Plasmids Tetracyclinresistenz auf.

2.1.1.2.5 *Escherichia coli* Top 10 pTKGH

Der transformierte *E. coli*-Stamm Top 10 pTKGH wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Er enthält das Plasmid pTKGH (Selden et al., 1986) mit dem für Human Growth Hormone codierenden Gen. Der Stamm weist aufgrund dieses Plasmids Ampicillinresistenz auf.

2.1.1.2.6 *Escherichia coli* Top 10 pSBC-1

Der transformierte *E. coli*-Stamm Top 10 pSBC-1 wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Er enthält das Plasmid pSBC-1 (Dirks et al., 1993) und weist aufgrund dieses Plasmids Ampicillinresistenz auf.

2.1.1.2.7 *Escherichia coli* Top 10 pSBC-2

Der transformierte *E. coli*-Stamm Top 10 pSBC-2 wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Er enthält das Plasmid pSBC-2 (Dirks et al., 1993) und weist aufgrund

dieses Plasmids Ampicillinresistenz auf.

2.1.1.2.8 *Escherichia coli* Top 10 pSBC-1-HGH

Der transformierte *E. coli*-Stamm Top 10 pSBC-1-HGH wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Er enthält das Plasmid pSBC-1-HGH (siehe 3.2.3) mit dem für Human Growth Hormone codierenden Gen. Der Stamm weist aufgrund dieses Plasmids Ampicillinresistenz auf.

2.1.1.2.9 *Escherichia coli* Top 10 pSBC-2-PYC2

Der transformierte *E. coli*-Stamm Top 10 pSBC-2-PYC2 wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Er enthält das Plasmid pSBC-2-PYC2 (siehe 3.2.4) mit dem für Pyruvat-Carboxylase 2 aus *Saccharomyces cerevisiae* codierenden Gen. Der Stamm weist aufgrund dieses Plasmids Ampicillinresistenz auf.

2.1.1.3 Hefen

2.1.1.3.1 *Saccharomyces cerevisiae* GX1

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* GX1 wurde von Dr. Joop van den Heuvel (Arbeitsgruppe Mikrobielle Systeme, GBF, Braunschweig) zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Nährmedien

2.1.2.1 Nährmedien zur Kultivierung von Säugerzelllinien

2.1.2.1.1 MEM Alpha Medium

Die Kultivierungen der Zelllinie CHO DG44/D3 erfolgten in Medien auf der Basis von MEM Alpha Medium (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland).

Das MEM Alpha Basalmedium ist in zwei Modifikationen erhältlich. Da die Zelllinie CHO DG44/D3 keine Dihydrofolat-Reductase exprimiert und somit Thymidin und Purinverbindungen nicht herstellen kann, enthält eine der Modifikationen des MEM Alpha Basalmediums Ribonucleoside und Desoxyribonucleoside. Die zweite Modifikation von MEM Alpha Basalmedium enthält weder Ribonucleoside noch Desoxyribonu-

cleoside. Diese Modifikation dient der Selektion von Zellen, die mit der Dihydrofolat-Reductase transfiziert worden sind. Erfolgreich transfizierte Zellen können ohne Zusatz von Nucleosiden im Medium wachsen.

Zur Herstellung von MEM Alpha Basalmedium wurden MEM Alpha Pulvermischung und $2,2 \text{ g l}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ (Sigma, St. Louis, MO, USA) in hochreinem Wasser gelöst und durch einen Filter mit einer Porengröße von $0,1 \text{ }\mu\text{m}$ (Acrocap, Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA) sterilfiltriert. Anschließend wurde das Medium durch eine drei Tage andauernde Inkubation bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ einem Steriltest unterzogen. Nach diesem Steriltest wurde das Basalmedium bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.1.2.1.2 MEM Alpha NOVO High Glucose

Das Kulturmedium für die Zelllinie CHO DG44/D3 wird im Folgenden als MEM Alpha NOVO High Glucose bezeichnet. Dem MEM Alpha Basalmedium mit Nucleosiden wurde fötales Kälberserum (FCS, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) zu einer Konzentration von 5 % FCS zugesetzt. Weiterhin wurde das Basalmedium mit einer L-Prolin-Stammlösung und einer Glucose-Stammlösung supplementiert, so dass Konzentrationen von 150 mg l^{-1} L-Prolin und $3,65 \text{ g l}^{-1}$ Glucose eingestellt wurden.

Die L-Prolin-Stammlösung wurde angesetzt, indem $7,5 \text{ g}$ L-Prolin (Fluka, Buchs, Schweiz) in 50 ml hochreinem Wasser gelöst wurden. Die Lösung wurde anschließend durch einen Filter mit der Porengröße $0,1 \text{ }\mu\text{m}$ (Supor Acrodisc, Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA) sterilfiltriert und bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Zur Herstellung der Glucose-Stammlösung wurden $79,2 \text{ g}$ D-Glucose Monohydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 400 ml hochreinem Wasser gelöst. Diese Lösung wurde anschließend durch einen Filter der Porengröße $0,1 \text{ }\mu\text{m}$ (Acrocap, Gelman Sciences) sterilfiltriert und bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Beim Ansatz von einem Liter Kulturmedium MEM Alpha NOVO High Glucose wurden $730 \text{ }\mu\text{l}$ L-Prolin-Stammlösung und $14,5 \text{ ml}$ Glucose-Stammlösung zugesetzt.

2.1.2.1.3 Serum

Die zur Mediensupplementierung verwendeten Seren wurden zur Inaktivierung der

cytolytischen Proteine des Komplementsystems eine Stunde bei 56 °C in einem Wasserbad (Köttermann, Uetze-Hänigsen, Deutschland) inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert.

2.1.2.1.4 Geneticinhaltiges Selektionsmedium

Zur Selektion der erfolgreich mit pAG60 transfizierten bzw. mit pAG60 und pCMVSHE-PYC2 cotransfizierten CHO DG44/D3 (siehe 2.1.1.1.3 bzw. 2.1.1.1.2) wurde dem Kulturmedium MEM Alpha NOVO High Glucose (siehe 2.1.2.1.2) das Antibiotikum Geneticin (G418, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) in einer Konzentration von 600 $\mu\text{g l}^{-1}$ zugegeben. Dazu wurde eine Stammlösung von 3 g Geneticin in 30 ml hochreinem Wasser angesetzt, durch einen Filter mit 0,1 μm Porengröße (Supor Acrodisc 25, Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA) sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert. Einem Liter Kulturmedium wurden dann 6 ml Geneticin-Stammlösung zugegeben.

Die G418-Konzentration von 600 $\mu\text{g l}^{-1}$ wurde durch Kultivierung der Wildtypzelllinie CHO DG44/D3 in MEM Alpha NOVO High Glucose mit unterschiedlichen G418-Konzentrationen ermittelt. Bei dieser Vergleichskultivierung lagen die G418-Konzentrationen im Medium zwischen 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ und 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$ in Abständen von 50 $\mu\text{g l}^{-1}$. Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturplatten mit sechs Vertiefungen (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland). 600 $\mu\text{g l}^{-1}$ G418 wurde als die geringste Konzentration im Kulturmedium ermittelt die ausreichte, um ein Wachstum des Wildtyps zu verhindern und so die Selektion erfolgreich transfizierter Zellklone zu gewährleisten.

2.1.2.1.5 MEM Alpha Select- High Glucose

Zur Selektion der erfolgreich mit pAdD26SV(A)-3 und pSBC-1/2-HGH/PYC2 bzw. mit pAdD26SV(A)-3 und pSBC-1/2-HGH/PYC2wd cotransfizierten CHO DG44/D3 (siehe 2.1.1.1.4 und 2.1.1.1.5) wurde Kulturmedium auf der Basis von MEM Alpha Medium ohne Ribo- und Desoxyribonucleoside verwendet. Dieses Medium wird im Folgenden als MEM Alpha Select- High Glucose bezeichnet. Dem Basalmedium wurde dialysier-

tes fötales Kälberserum (dFCS, Sigma, St. Louis, MO, USA) zu einer Konzentration von 5 % dFCS zugesetzt. Weiterhin wurde das Basalmedium mit einer L-Prolin-Stammlösung und einer Glucose-Stammlösung (siehe 2.1.2.1.2) supplementiert, so dass Konzentrationen von 150 mg l⁻¹ L-Prolin und 3,65 g l⁻¹ Glucose eingestellt wurden.

2.1.2.1.6 MEM Alpha Select- High Glucose mit Methotrexat

Zur Amplifikation des transfizierten Dihydrofolat-Reductase-Gens und damit auch des jeweiligen cotransfizierten Gens wurde dem Selektionsmedium MEM Alpha Select-High Glucose (siehe 2.1.2.1.5) der DHFR-Inhibitor Methotrexat (MTX, Sigma, St. Louis, MO, USA) zugesetzt. Dazu wurde eine Methotrexat-Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mmol l⁻¹ MTX angesetzt. In 100 ml hochreinem Wasser wurden 45 mg MTX gelöst. Diese Lösung wurde anschließend durch einen Filter mit der Porengröße 0,1 µm sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

Schrittweises Erhöhen der Methotrexatkonzentration im Kulturmedium bewirkt eine Steigerung der Kopienzahl des Dihydrofolat-Reductase-Gens und damit eine Überproduktion des Enzyms (siehe 1.6). Zur Amplifikation des DHFR-Gens und des cotransfizierten Gens wurden die erfolgreich transfizierten CHO DG44/D3 (siehe 2.1.1.1.4 und 2.1.1.1.5) in MEM Alpha Select- High Glucose mit Methotrexat kultiviert. Zuerst erfolgte die Kultivierung in Medium mit 80 nM MTX. War keine Inhibierung des Wachstums der Zellen zu beobachten, wurde die MTX-Konzentration im Medium erhöht. Die MTX-Konzentration wurde zunächst auf 320 nmol l⁻¹ eingestellt, später auf 1 µmol l⁻¹. Bei dieser Konzentration zeigten die CHO DG44/D3, die mit pAdD26SV(A)-3 und den bicistronischen Plasmiden pSBC-1/2-HGH/PYC2 bzw. pSBC-1/2-HGH/PYC2wd cotransfiziert wurden (siehe 2.1.1.1.4 und 2.1.1.1.5), ein deutlich langsames Wachstum, so dass die MTX-Konzentration nicht weiter erhöht wurde.

2.1.2.1.7 Kryomedium CHO NOVO

Zur Kryopräservierung (siehe 2.1.3.1.4) von CHO DG44/D3, die in Medium auf Basis von MEM Alpha mit Nucleosiden (siehe 2.1.2.1.1) kultiviert worden waren, wurde das

Kryomedium CHO NOVO verwendet. Dieses Medium setzt sich folgendermaßen zusammen: 80 % MEM Alpha (mit Nucleosiden), 10 % FCS, 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma, St. Louis, MO, USA). DMSO wird Kryomedien zugesetzt, da es die Bildung von zellschädigenden Kristallen verhindert (Lindl und Bauer, 1994).

2.1.2.1.8 Kryomedium CHO NOVO w/o

Zur Kryopräservierung (siehe 2.1.3.1.4) von CHO DG44/D3, die in Medium auf Basis von MEM Alpha ohne Nucleoside (siehe 2.1.2.1.1) kultiviert worden waren, wurde das Kryomedium CHO NOVO w/o verwendet. Dieses Medium setzt sich folgendermaßen zusammen: 80 % MEM Alpha (ohne Nucleoside), 10 % dFCS (Sigma, St. Louis, MO, USA), 10 % DMSO (Sigma, St. Louis, MO, USA).

2.1.2.2 Nährmedien zur Kultivierung von *Escherichia coli*

2.1.2.2.1 LB Medium (Luria-Bertani Medium)

Zur Kultivierung von *E. coli* TG1 und *E. coli* Top 10 wurde flüssiges LB Medium verwendet. In einem Liter hochreinem Wasser wurden 10 g Bacto-Trypton (Difco, Detroit, MI, USA), 5 g Hefeextrakt (Difco) und 10 g NaCl (Riedel-de-Haën, Seelze, Deutschland) gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert mit 5 M NaOH (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf 7,5 eingestellt. Die Lösung wurde 20 Minuten autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

2.1.2.2.2 LB Selektionsmedium mit Ampicillin

Zur Selektion von transformierten *E. coli* TG1 und *E. coli* Top 10 auf Ampicillinresistenz wurden dem autoklavierten LB Medium pro Liter 10 ml einer sterilen Ampicillin-Stammlösung zu einer Konzentration von 50 mg l⁻¹ Ampicillin zugesetzt. Zum Ansatz der Ampicillin-Stammlösung wurden 500 mg Ampicillin (Serva, Heidelberg, Deutschland) in 100 ml hochreinem Wasser gelöst. Anschließend wurde diese Lösung durch einen Filter mit der Porengröße 0,22 µm (Millex GS, Millipore, Eschborn, Deutschland) sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

2.1.2.2.3 LB Selektionsmedium mit Tetracyclin

Zur Selektion von transformierten *E. coli* Top 10 auf Tetracyclinresistenz wurden dem autoklavierten LB Medium pro Liter 10 ml einer sterilen Tetracyclin-Stammlösung zu einer Konzentration von 15 mg l^{-1} Tetracyclin zugesetzt. Zum Ansatz der Tetracyclin-Stammlösung wurden 150 mg in einer Mischung von 50 ml Ethanol (J. T. Baker, Griesheim, Deutschland) und 50 ml hochreinem Wasser gelöst. Anschließend wurde diese Lösung durch einen Filter mit der Porengröße $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ (Millex GS, Millipore, Eschborn, Deutschland) in eine Glasflasche (Schott, Mainz, Deutschland) sterilfiltriert. Die Tetracyclin-Stammlösung wurde lichtgeschützt bei $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, da Tetracyclin unter Lichteinwirkung zerfällt (Maniatis et al., 1982).

2.1.2.2.4 Agarhaltiges LB Selektionsmedium mit Ampicillin

Um Einzelkolonien von transformierten *E. coli* auf Ampicillinresistenz selektieren zu können, wurde pro Liter LB Medium (siehe 2.1.2.2.1) 20 g Bacto-Agar (Difco, Detroit, MI, USA) zugesetzt. Der Ansatz wurde 20 Minuten autoklaviert und im Wasserbad (Köttermann, Uetze-Hänigsen, Deutschland) auf $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. Unter der sterilen Arbeitsbank (Heraeus Laminair HBB2472S, Kendro, Hanau, Deutschland) wurden der Lösung pro Liter 10 ml der sterilen Ampicillin-Stammlösung (siehe 2.1.2.2.2) zugesetzt und so eine Ampicillinkonzentration von 50 mg l^{-1} eingestellt. Diese Lösung wurde anschließend unter der sterilen Arbeitsbank in Petrischalen mit 58 cm^2 Wachstumsfläche (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) gegossen, in denen sie bei weiterer Abkühlung aushärtete. Die Petrischalen mit dem ampicillinhaltigen LB Agar wurden bei $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zu einem Monat gelagert.

2.1.2.2.5 Agarhaltiges LB Selektionsmedium mit Tetracyclin

Das agarhaltige LB Selektionsmedium mit Tetracyclin wurde analog zum ampicillinhaltigen LB Selektionsmedium (siehe 2.1.2.2.4) angesetzt. Nach dem Autoklavieren des agarhaltigen LB Mediums und Abkühlen auf $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (siehe 2.1.2.2.4) wurden der Lösung pro Liter 10 ml der sterilen Tetracyclin-Stammlösung (siehe 2.1.2.2.3) zugesetzt und so eine Tetracyclinkonzentration von 15 mg l^{-1} eingestellt. Diese Lösung

wurde anschließend unter der sterilen Arbeitsbank in Petrischalen mit 58 cm² Wachstumsfläche (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) gegossen, in denen sie bei weiterer Abkühlung aushärtete. Da Tetracyclin eine lichtempfindliche Substanz ist (Maniatis et al., 1982), wurden die Petrischalen mit Aluminiumfolie (BLB, Braunschweig, Deutschland) umwickelt und anschließend bei 4 °C bis zu einem Monat gelagert.

2.1.2.3 Nährmedium zur Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* GX1

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* GX1 wurde in Yeast Nitrogen Base Medium (YNB Medium) supplementiert mit 20 g l⁻¹ Glucose kultiviert.

2.1.2.3.1 YNB-Stammlösung

Zum Ansatz einer YNB-Stammlösung wurden 67 g Yeast Nitrogen Base (Difco, Detroit, MI, USA) in einem Liter hochreinem Wasser gelöst. Diese Lösung wurde anschließend 20 Minuten autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

2.1.2.3.2 Glucosestammlösung

Zum Ansatz einer Glucosestammlösung wurden 220 g D-Glucose-Monohydrat (Riedel de Haën, Seelze, Deutschland) in einem Liter hochreinem Wasser gelöst. Diese Lösung wurde anschließend 20 Minuten autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

2.1.2.3.3 YNB-Medium

Zum Ansatz von YNB-Medium wurden 200 ml YNB-Stammlösung (siehe 2.1.2.3.1) und 200 ml Glucosestammlösung (siehe 2.1.2.3.1) mit 1600 ml sterilem, hochreinem Wasser vermischt. Diese Lösung wurde anschließend bei 4 °C gelagert.

2.1.3 Kultivierung von Zellen

2.1.3.1 Kultivierung von Säugerzellen

Die Kultivierung von Säugerzellen erfolgte unter Laminar Flow Arbeitsbänken der Sicherheitsstufe 2 (Heraeus Laminair HBB2472S, Kendro, Hanau, Deutschland).

2.1.3.1.1 Stammhaltung von adhärent wachsenden Zellen

Zur Stammhaltung adhärent wachsender Zellen wurden diese in Zellkulturflaschen (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) bei 37 °C, 5,5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit (Heraeus Inkubator Cytoperm 8080, Kendro, Hanau) kultiviert.

Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 25 cm² (T-25) wurden mit 10 ml Medium gefüllt, Zellkulturflaschen mit 75 cm² Wachstumsfläche (T-75) mit 20 ml Medium und Zellkulturflaschen mit 175 cm² Wachstumsfläche (T-175) mit 50 ml Kulturmedium. Bei Erreichen der Konfluenz erfolgte die Passagierung der Zellen. Dazu wurde das Kulturmedium mit einer Pasteur-Pipette (BLB, Braunschweig, Deutschland) abgesaugt. Zum Ablösen der Zellen wurde Trypsin-EDTA-Lösung (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) auf die Zellen gegeben: 1 ml bei T-25-, 2 ml bei T-75- und 3 ml bei T-175-Kulturflaschen. Da das Temperaturoptimum der Trypsinaktivität bei 37 °C liegt, wurden die Kulturflaschen mit Trypsinlösung zum Ablösen der Zellen drei Minuten bei 37 °C inkubiert. Mit einem Mikroskop (ID10, Zeiss, Göttingen, Deutschland) wurde überprüft, ob die Zellen sich vollständig abgelöst haben. Hat die Ablösung der Zellen nicht stattgefunden, wurde sie durch vorsichtiges Klopfen mit der Hand an der Kulturflasche erreicht. Die Zellen wurden anschließend im Verhältnis 1:8 umgesetzt. Die Aufhebung der Trypsinaktivität erfolgte dabei durch das FCS im Kulturmedium.

2.1.3.1.2 Stammhaltung von in Suspension wachsenden Zellen

Die Stammhaltung von in Suspension wachsenden Zellen erfolgte in 125 ml Röhreinheiten (Spinnerflaschen, Techne, Cambridge, UK) bei 37 °C, 5,5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit (Salvis Inkubator Biocenter 2001, Integra, Fellbach, Deutschland). Die Röhreinheiten wurden mit 50 ml Kulturmedium gefüllt und auf einem Tableau für Röhreinheiten (Cellspin, Integra, Fernwald, Deutschland) bei 40 Upm durchmischt. Bei einer Zellkonzentration von $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ wurden die Zellen passagiert, wobei eine Zellkonzentration von $3 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ eingestellt wurde.

2.1.3.1.3 Subklonierung von transfizierten Zellen

Nach der Selektion transfizierter Zellen (siehe 2.4.3) wurde das Kulturmedium der Petrischale abgesaugt und einzelne Klone mit einer sterilen Pipettenspitze P10 (Gilson, Abimed, Langenfeld, Deutschland) in eine sterile Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) überführt. Eine Vertiefung enthielt 200 µl Kulturmedium. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellklone in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland), die jeweils mit einem ml Kulturmedium gefüllt waren, passagiert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen zunächst in T-25-Flaschen umgesetzt und anschließend in T-75-Flaschen. Schließlich erfolgte die Kryopräservation (siehe 2.1.3.1.4).

Zum Ablösen der Zellen nach der Kultivierung in sterilen Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen wurden pro Vertiefung 50 µl Trypsin-EDTA-Lösung (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben. Das Ablösen der Zellen nach der Kultivierung in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen wurde durch die Zugabe von 200 µl Trypsin-EDTA-Lösung erreicht.

2.1.3.1.4 Kryopräservation

Zur Langzeitlagerung (Kryopräservation) von Säugerzellen wurde zunächst eine definierte Menge von adhärent wachsenden Zellen abgelöst oder direkt aus einer Suspensionskultur entnommen und anschließend drei Minuten bei Raumtemperatur und 190 × g zentrifugiert (Centrifuge 5403, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen wurden in 1,8 ml Kryomedium (siehe 2.1.2.1.7 und 2.1.2.1.8) aufgenommen, in ein Kryoröhrchen (Nalgene, Rochester, NY, USA) überführt und in einem speziellen, mit Isopropanol (J. T. Baker, Griesheim, Deutschland) gefüllten Gefriercontainer (Nalgene, Rochester, NY, USA) für 24 Stunden bei -70 °C gelagert. Anschließend erfolgte die Lagerung in einem Kryotank in der Dampfphase über flüssigem Stickstoff bei -170 °C.

2.1.3.2 Kultivierung von *Escherichia coli*

2.1.3.2.1 Kultivierung

E. coli Zellen wurden nach Standardmethoden (Maniatis et al., 1982) auf Agarplatten oder in Flüssigmedium in Schüttelkolben (Schott, Mainz, Deutschland) bei 37 °C im Brutraum kultiviert. Die Erlenmeyerkolben wurden mit 180 Upm geschüttelt (Certomat, Braun, Melsungen, Deutschland).

2.1.3.2.2 Kryopräservation

Die Langzeitlagerung (Kryopräservation) von *E. coli* Zellen erfolgte in Glycerinkulturen bei -70 °C. Dazu wurde zunächst Glycerin in einer Konzentration von 87 % (Merck, Darmstadt, Deutschland) 20 Minuten autoklaviert und bei 4 °C gelagert. *E. coli* wurden im Schüttelkolben (Schott, Mainz, Deutschland) bis zu einer optischen Dichte von 600 ($OD_{600} = 1$) kultiviert. 730 µl dieser Kultur und 170 µl der sterilen Glycerinlösung wurden in ein 2 ml Kryoröhrchen (Nalgene, Rochester, NY, USA) gefüllt, gemischt (Vortex Genie 2, Bender & Hobein, Zürich, Schweiz) und bei -70 °C gelagert.

2.1.3.3 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* GX1

2.1.3.3.1 Kultivierung

Die Kultivierung der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* GX1 erfolgte im Schüttelkolben (Schott, Mainz, Deutschland) bei 30 °C im Brutraum. Die Kolben wurden bei 130 Upm geschüttelt (Certomat, Braun, Melsungen, Deutschland).

2.1.3.3.2 Kryopräservation

Die Langzeitlagerung (Kryopräservation) von *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte in Glycerinkulturen bei -70 °C. Die Hefe wurde in Schüttelkolben (Schott, Mainz, Deutschland) bis zu einer optischen Dichte von 600 ($OD_{600} = 1$) kultiviert. 730 µl dieser Kultur und 170 µl einer sterilen Glycerinlösung (siehe 2.1.3.2.2) wurden in ein 2 ml Kryoröhrchen (Nalgene, Rochester, NY, USA) gefüllt, gemischt (Vortex Genie 2, Bender & Hobein, Zürich, Schweiz) und bei -70 °C gelagert.

2.1.4 Begleitende Analytik bei Säugerzellkultivierungen

2.1.4.1 Bestimmung der Zellkonzentration

Die Zellkonzentration wurde durch Zählung der Zellkerne ermittelt. Diese Methode eignet sich besonders zur Konzentrationsbestimmung von Zellen, die Sphäroide bilden (Lin et al., 1991).

1 ml Zellsuspension wurde drei Minuten bei Raumtemperatur und 12000 Upm zentrifugiert (Hettich Mikroliter, Hettich, Tuttlingen, Deutschland). 850 µl Überstand wurden abgenommen und 850 µl Kristallviolettlösung (2,1 % Zitronensäuremonohydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,05 % Kristallviolett (Merck), 1 % Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO, USA)) wurden zugegeben. Es folgte eine einminütige Mischung (Vortex Genie 2, Bender & Hobein, Zürich, Schweiz), wodurch die Zellen lysiert wurden. Die freigesetzten, violett angefärbten Kerne wurden mit einer Neubauer-Zählkammer (BLB, Braunschweig, Deutschland) bei 400-facher Vergrößerung (Axiovert, Zeiss, Göttingen, Deutschland) gezählt.

2.1.4.2 Bestimmung der Zellvitalität

Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mittels der Trypanblaufärbung. Trypanblau ist ein sehr hydrophiler Farbstoff, der nur die geschädigte Plasmamembran toter oder sterbender Zellen durchdringen kann. Auf diese Weise können die lebenden Zellen (im Phasenkontrast gelblichgrün leuchtend) und die spezifisch blau angefärbten toten differenziert ausgezählt werden.

100 µl Zellsuspension wurden mit 100 µl einer Lösung von 0,5 % Trypanblau (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) vermischt. Die Zellen wurden bei 400-facher Vergrößerung (Axiovert, Zeiss, Göttingen, Deutschland) mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (BLB, Braunschweig, Deutschland) gezählt.

2.1.4.3 Bestimmung der Glucose- und Lactatkonzentration

Die Bestimmung der Glucose- und Lactatkonzentrationen von Zellkulturüberständen erfolgte mittels eines Glucose/Lactat-Analysators (YSI 2000, Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH, USA). Die Messung beruht auf einem enzymatisch-elek-

trochemisch gekoppelten Prozess. Über eine Fließinjektionsanalyse wird das von den immobilisierten Enzymen Glucose- und Lactat-Oxidase gebildete H_2O_2 an einer Pt/AgCl/Ag-Elektrode amperometrisch gemessen. Die Glucose- und Lactatkonzentration wird vom Analysator automatisch berechnet und direkt angegeben.

2.1.4.4 Bestimmung der Konzentration freier Aminosäuren

Die Konzentrationen freier Aminosäuren in Zellkulturüberständen wurden über ein HPLC-System (Kontron System 450 MT2, Bio-Tek, Neufahrn, Deutschland) (Larsen und West, 1981; Cooper et al., 1984a und 1984b; Fürst et al., 1990) bestimmt.

Zunächst wurden die Proteine mit Perchlorsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) gefällt, anschließend erfolgte die Umsetzung der freien Aminosäuren alkalisch mit ortho-Phthaldialdehyd (Serva, Heidelberg, Deutschland) in Gegenwart von Mercaptopropionsäure (Fluka, Buchs, Schweiz) zu fluoreszenzfähigen Isoindolderivaten. Nun wurden diese über eine Reversed-Phase-Säule (AminoOPA 3 μm , Grom, Herrenberg, Deutschland) getrennt und fluorometrisch detektiert (Kontron Detektor SFM 25, Bio-Tek). Die Quantifizierung erfolgte über den internen Standard Norvalin (Ryll et al., 1990).

2.1.4.5 Bestimmung der Konzentration von Human Growth Hormone

Die Konzentration von Human Growth Hormone (HGH) wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen ELISA-Kits (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) bestimmt. Die Durchführung des ELISA erfolgte nach Vorschrift des Herstellers. Der HGH-ELISA basiert auf dem Sandwich-ELISA-Prinzip. Auf den vom Hersteller mitgelieferten Mikrotiterplatten sind bereits Antikörper gegen HGH (anti-HGH) gebunden. Wurde der HGH enthaltende Zellkulturüberstand in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gefüllt, band das HGH an die anti-HGH-Antikörper. Anschließend wurde ein mit Digoxigenin markierter Antikörper gegen HGH (anti-HGH-DIG) auf die Mikrotiterplatte gegeben, danach ein Peroxidase-gekoppelter Antikörper gegen Digoxigenin (anti-DIG-POD). Schließlich wurde das Peroxidase-Substrat ABTS[®] zugegeben. Die Peroxidase katalysiert die Spaltung des Substrats, wobei ein grün gefärbtes Reaktionsprodukt

entsteht. Die Absorption dieser Färbung wurde in einem ELISA-Reader (SLT Modell 340 ATTC, SLT, Crailsheim, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 492 nm gemessen. Durch Vergleich mit HGH-Standards wurde die HGH-Konzentration in der Probe bestimmt.

2.1.4.6 Bestimmung der intrazellulären Nukleotidkonzentrationen

2.1.4.6.1 Extraktion der Nukleotide

Zur Extraktion der intrazellulären Nukleotide aus Säugerzellen wurde die von Ryll und Wagner (1991) sowie Ryll (1992) ausführlich beschriebene Methodik verwendet, die hier in Kürze beschrieben wird.

5 ml Zellsuspension wurden 3 Minuten bei 0 °C und 190 × g zentrifugiert (Centrifuge 5403, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Das Zellpellet wurde zweimal mit je 500 µl 0,5 M PCA (Merck, Darmstadt, Deutschland) 3 Minuten auf Eis extrahiert und anschließend 3 Minuten bei 0 °C und 1680 × g (Centrifuge 5403, Eppendorf) zentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden mit einer Lösung von 2,5 M KOH (Merck) und 1,5 M K₂HPO₄ (Merck) auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt. Das ausfallende KClO₄ wurde 10 Minuten bei 4 °C und 1680 × g abzentrifugiert (Centrifuge 5415, Eppendorf). Anschließend wurden 900 µl Überstand durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm (Millipore, Eschborn, Deutschland) filtriert und bei -20 °C gelagert. Das Restvolumen des Extrakts wurde mit einer Spritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) bestimmt.

2.1.4.6.2 HPLC-System zur Quantifizierung der extrahierten intrazellulären Nukleotide aus Säugerzellen

Die wie in 2.1.4.6.1 beschriebenen extrahierten intrazellulären Nukleotide aus Säugerzellen wurden mit einem HPLC-System getrennt und quantifiziert. Das HPLC-System bestand aus zwei Pumpen (Kontron Instruments Modell 420, Bio-Tek, Neufahrn, Deutschland), einer Mischkammer (Knauer, Berlin, Deutschland), einem Autosampler (Kontron Instruments Modell SA360, Bio-Tek), einer Vor- und Trennsäule (Supel-Guard bzw. Supelcosil LC18, Supelco, Bellefonte, PA, USA), einem UV-Detektor

(Kontron Instruments Modell D430, Bio-Tek) und einem Messgerät zur Bestimmung des Volumenstroms (Modell Phase Sep, Phase Separations Ltd., Deeside, UK).

Die Nukleotide wurden durch Ionenpaarchromatographie unter Verwendung eines hochdruckseitig gemischten Gradientenelutionssystems getrennt (Ryll und Wagner, 1991). Zum Ansatz des Laufpuffers wurde einem 100 mmol l⁻¹ Kaliumphosphatpuffer (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit einem pH-Wert von 6,0 Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (TBA, Fluka, Buchs, Schweiz) als Ionenpaarreagenz zugesetzt. Der pH-Wert wurde mit KOH (Merck) auf 5,6 eingestellt, anschließend wurde der Laufpuffer durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert (Sartorius, Göttingen, Deutschland). Der Elutionspuffer bestand aus 70 % filtriertem Laufpuffer und 30 % Methanol (J. T. Baker, Griesheim, Deutschland). Der gefahrene Gradient und die Trennungseigenschaften sind bei Ryll und Wagner (1991) genau beschrieben. Über den auf 4 °C gekühlten Autosampler wurden die Nukleotidextraktproben injiziert.

Die Quantifizierung der Nukleotide erfolgte durch Integration der Peakflächen mit der Computersoftware Kroma System 2000 (Bio-Tek) auf Basis von Kalibrierungen für die Nucleosidmono-, -di- und -triphosphate sowie Nukleotidzucker im Bereich von 100 pmol bis 1000 pmol. Die Peaks aus Nukleotidextrakten wurden durch den Vergleich mit Retentionszeiten von Nukleotidstandards identifiziert.

2.1.4.7 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

2.1.4.7.1 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration nach Bradford

Die Gesamtproteinkonzentration der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Die Methode basiert auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Blue G 250 an Proteine, wodurch sich sein Absorptionsmaximum von 450 nm auf 595 nm verschiebt. Die Durchführung der Proteinbestimmung in den unter 2.2.2.2 beschriebenen Zellaufschlüssen erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen Kit BIOQUANT Protein (Merck, Darmstadt, Deutschland) nach Vorschrift des Herstellers.

2.1.4.7.2 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration mit der BCA-Methode

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration von Säugerzellen konnte die oben beschriebene Methode von Bradford (1976) nicht angewendet werden, da der zum Zellaufschluss verwendete Puffer (Triton-Puffer, s. u.) Triton X-100 in einer Konzentration von 2,5 v/v % enthält; diese Konzentration von Triton X-100 wirkt sich nach Angaben des Herstellers (Merck) störend auf die Messreaktion aus. Daher wurde zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration von Säugetierzellen die BCA-Methode nach Smith et al. (1985) herangezogen.

Bei dieser Methode findet zunächst durch Zugabe von CuSO_4 zur Proteinlösung die Bioretreaktion statt, bei der sich ein Protein-Kupfer-Komplex ausbildet, in dem das Kupfer als Cu^+ -Ion vorliegt. Anschließend erfolgt durch Zugabe von Bicinchoninsäure (BCA) die Ausbildung eines BCA- Cu^+ -Komplexes. Durch diesen Komplex erhält die Lösung eine purpurviolette Färbung, die ein Absorptionsmaximum bei 562 nm aufweist.

Zunächst erfolgte der Aufschluss der Zellen für die Proteinbestimmung. 5×10^5 bis 2×10^6 Zellen wurden entnommen und durch Zentrifugation von 3 Minuten bei 4 °C und $190 \times g$ sedimentiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet mit einem ml PBS gewaschen und erneut 3 Minuten bei 4 °C und $190 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einem ml Triton-Puffer (siehe unten) aufgenommen, mit dem Vortex-Schüttler (Vortex Genie2, Bender & Hobein, Zürich, Schweiz) homogenisiert und bis zur Messung bei -20 °C eingefroren. Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen Kit BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, IL, USA) nach der Vorschrift des Herstellers.

Der zum Zellaufschluss verwendete Triton-Puffer setzte sich folgendermaßen zusammen: 100 mmol l^{-1} NaCl (Riedel de Haën, Seelze, Deutschland), 50 mmol l^{-1} HEPES (Sigma, St. Louis, MO, USA), 2,5 v/v % Triton X-100 (Serva, Heidelberg, Deutschland). Der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt.

2.2 Aktivitätsbestimmung der Pyruvat-Carboxylase

2.2.1 Extraktionspuffer

2.2.1.1 Puffer zur Enzymextraktion aus Säugerzellen

Der zur Extraktion der Pyruvat-Carboxylase aus Säugerzellen verwendete Puffer entsprach dem von Ahmad et al. (1986) verwendeten mit geringfügigen Modifikationen. Er setzte sich folgendermaßen zusammen: 300 mmol l⁻¹ Sucrose (Sigma, St. Louis, MO, USA), 100 mmol l⁻¹ KCl (Fluka, Buchs, Schweiz), 10 mmol l⁻¹ MgCl₂ (Merck, Darmstadt, Deutschland), 1 mmol l⁻¹ EDTA (Merck), 10 mmol l⁻¹ DTT (Serva, Heidelberg, Deutschland), 0,1 % (v/v) Triton X-100 (Serva), 100 µmol l⁻¹ Leupeptin (Sigma), 1 µmol l⁻¹ Pepstatin A (Sigma), 50 mmol l⁻¹ Tris (Sigma). Der pH-Wert wurde mit 5 mol l⁻¹ HCl (Merck) auf 7,4 eingestellt.

2.2.1.2 Puffer zur Enzymextraktion aus *Saccharomyces cerevisiae*

Der zur Extraktion der Pyruvat-Carboxylase aus *Saccharomyces cerevisiae* verwendete Puffer wurde nach Brewster et al. (1994) mit leichten Modifikationen angesetzt. Er hatte folgende Zusammensetzung: 10 mmol l⁻¹ MgCl₂ (Merck, Darmstadt, Deutschland), 8 % Glycerol (Merck), 100 mmol l⁻¹ Tris (Sigma, St. Louis, MO, USA). Der pH-Wert wurde mit 5 mol l⁻¹ HCl (Merck) auf 7,2 eingestellt.

2.2.2 Zellaufschluss

2.2.2.1 Aufschluss von Säugerzellen

Zur Bestimmung der Aktivität der Pyruvat-Carboxylase ist der Aufschluss von mindestens 10⁸ Zellen erforderlich. Diese Zellmenge wurde aus einer Suspensionskultur entnommen und 3 Minuten bei 4 °C und 190 × g abzentrifugiert (Centrifuge 5403, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen erneut 3 Minuten bei 4 °C und 190 g zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 12 ml Extraktionspuffer (siehe 2.2.1.1) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte dann in einem eisgekühlten Homogenisator (Braun, Melsungen, Deutschland) durch

20 Stöße. Hiernach wurde das Zellysat 3 Minuten bei 4 °C und 2600 g zentrifugiert und der Überstand für den Enzymtest eingesetzt.

2.2.2.2 Aufschluss von Hefezellen

Für die Aktivitätsbestimmung der Pyruvat-Carboxylase in Hefezellen wurden 600 ml einer Suspensionskultur von *Saccharomyces cerevisiae* GX1 bei einer $OD_{600} = 1$ entnommen. Die Zellen wurden 5 Minuten bei $4100 \times g$ und 4 °C abzentrifugiert (Sorvall RC5-C, Kendro, Hanau, Deutschland). Das Zellpellet wurde mit 40 ml eiskaltem PBS gewaschen und erneut 5 Minuten bei $4100 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Anschließend erfolgte das Resuspendieren des Pellets in 11,5 ml Extraktionspuffer (siehe 2.2.1.2). Zu dieser Suspension wurden 19,2 g Glasperlen (425-600 Microns, Sigma, St. Louis, MO, USA) gegeben und die Zellen 3 Minuten durch Mischen (Vortex Genie 2, Bender & Hobein, Zürich, Schweiz) aufgeschlossen. Der Aufschluss wurde 5 Minuten bei $4100 \times g$ und 4 °C zentrifugiert (Centrifuge 5403, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) um die Glasperlen und die Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde für die Bestimmung der Aktivität der Pyruvat-Carboxylase verwendet.

2.2.3 Enzymreaktion und Messmethode

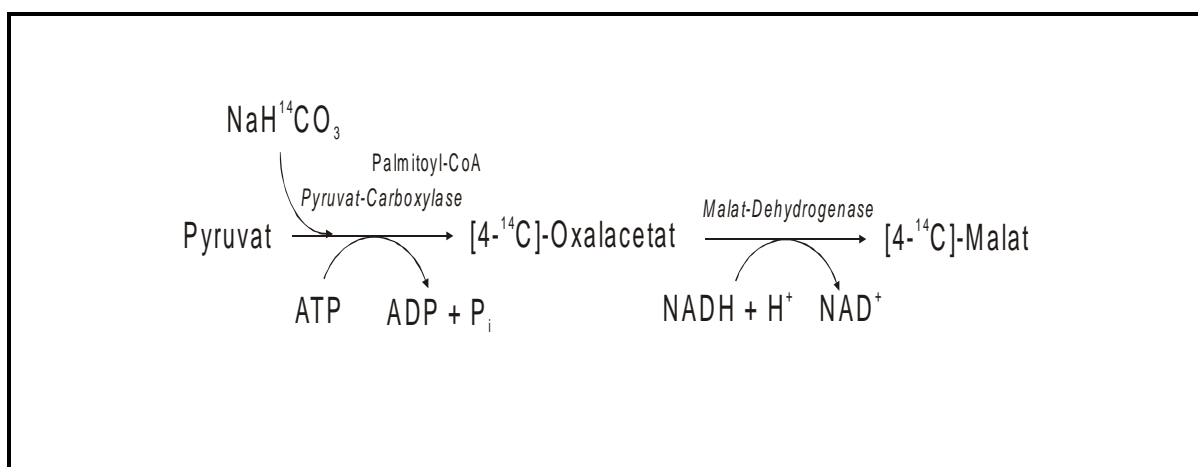


Abb. 2.2.1: Reaktion zur Aktivitätsbestimmung der rekombinanten Hefe-Pyruvat-Carboxylase (PYC2)

Der Test zur Bestimmung der Aktivität der Pyruvat-Carboxylase wurde nach Atkin et al. (1979) und Irani (2000) modifiziert. Er basiert auf der Reaktion von radioaktiv markiertem CO_2 mit Pyruvat, wobei radioaktiv markiertes Oxalacetat entsteht (siehe Abb. 2.2.1). Dieses wird durch die Malat-Dehydrogenase zu radioaktiv markiertem Malat umgesetzt. Nicht gebundenes $^{14}\text{CO}_2$ wird nach der Reaktion durch Begasung aus dem Ansatz ausgetrieben, so dass schließlich das entstandene Malat nachgewiesen wird.

In 7,5 ml Zelllysats (siehe 2.2.2.1 und 2.2.2.2) wurden 8,3 mg Natriumpyruvat (Sigma, St. Louis, MO, USA), 23 mg ATP (Sigma), 2,5 mg Palmitoyl-CoA (Sigma) und 2,1 mg NADH (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) gelöst. Durch die Zugabe von 20 μl Malat-Dehydrogenase (Roche Diagnostics) und 376 μl $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (Amersham, Braunschweig, Deutschland) wurde die Enzymreaktion gestartet. Als Blindproben wurden in 2,5 ml Zelllysats die oben angeführten Reaktanden mit Ausnahme von Natriumpyruvat in stöchiometrisch äquivalenten Mengen gelöst.

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Dem Reaktionsansatz wurden unmittelbar nach dem Start der Reaktion zwei Aliquots zu je 500 μl entnommen, und durch Zugabe von 55 μl 5 M PCA (Riedel de Haën, Seelze, Deutschland) wurde die Enzymreaktion gestoppt. Diese beiden Proben dienen als Nullwert. Der übrige Reaktionsansatz wurde in Aliquots zu je 500 μl aufgeteilt. Diese wurden bei 37 °C im Thermoblock (DigiBlock, Laboratory Devices, Holliston, MA, USA) inkubiert. Nach 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten wurden je 55 μl 5 M PCA zu zwei Aliquots gegeben, so dass die Enzymreaktion gestoppt wurde. Die ausfallenden Proteine wurden bei 14000 Upm (Centrifuge 5412, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. 500 μl Überstand wurden in ein Szintillationsröhrchen (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA) gefüllt und unter einem Abzug 4 Minuten mit CO_2 begast, um nicht gebundenes $^{14}\text{CO}_2$ aus der Lösung auszutreiben. Dazu wurde eine Pasteur-Pipette mit dem Ende eines Silikonschlauchs verbunden, durch den CO_2 strömte. Die Pasteur-Pipette wurde so weit in das Szintillationsröhrchen mit der Probe eingeführt, dass sich ihre Spitze kurz oberhalb des Flüssigkeitsspiegels befand und der Gasaustausch erfolgen konnte. Anschließend

wurden 2,5 ml Szintillationscocktail (Quicksafe A, Zinsser, Frankfurt, Deutschland) zugegeben und mit der Probe durch leichtes Schütteln (Vortex Genie 2, Bender & Hobein, Zürich, Schweiz) vermischt. Im Szintillationszähler (LS 5000 CE, Beckman Instruments) wurde die Radioaktivität der Proben gemessen.

2.2.4 Bestimmung der Enzymaktivität

Zur Bestimmung der Konzentration des in der Pyruvat-Carboxylasereaktion gebundenen $^{14}\text{CO}_2$ wurden aus einer $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ -Lösung (Amersham, Braunschweig, Deutschland) mit einer Radioaktivität von $9,25 \times 10^7 \text{ Bq ml}^{-1}$ und $3,7 \times 10^6 \text{ Bq mmol}^{-1}$ eine Verdünnungsreihe im Bereich von 18 Bq bis 37000 Bq angesetzt. Die Proben dieser Verdünnungsreihe wurden im Szintillationszähler vermessen (LS 5000 CE, Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA). Die Zählraten pro Minute wurden gegen die Radioaktivität in Bq aufgetragen. Über die sich dabei ergebende Kalibriergerade wurden den bei der Vermessung der Proben erhaltenen Zählraten pro Minute die entsprechende Radioaktivitätsmenge und damit eine bestimmte Konzentration zugewiesen.

2.3 Nachweis der Transkription des für die Pyruvat-Carboxylase codierenden Gens durch Northern Blotting

2.3.1 Isolierung der RNA aus Säugerzelllinien

Zum Nachweis der Transkription des für die Pyruvat-Carboxylase codierenden Gens wurde die cytoplasmatische RNA aus der Zelllinie CHO DG44/D3 isoliert; dazu wurden 5×10^7 Zellen benötigt. Die Isolierung der cytoplasmatischen RNA wurde mit dem kommerziell erhältlichen Kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Sie erfolgte gemäß den Vorschriften des Herstellers unter RNase-freien Bedingungen. Die aufgereinigte RNA wurde in 500 µl hochreinem autoklavierten Wasser aufgenommen. Durch Messung der Extinktion bei 260 nm (Spectroquant, Bio-Rad, München,

Deutschland) wurde die Konzentration der RNA bestimmt. Dabei wurde zugrunde gelegt, dass eine $OD_{260} = 1$ einer RNA-Konzentration von $40 \mu\text{g l}^{-1}$ entspricht (Maniatis et al., 1982). Um eine eventuelle Kontamination mit Proteinen festzustellen wurde außerdem die Extinktion bei 280 nm gemessen. Das Verhältnis von OD_{260} zu OD_{280} liegt bei reiner RNA bei 2,0; im Fall einer Proteinkontamination ist der Wert deutlich geringer (Maniatis et al., 1982).

2.3.2 Auftrennung der isolierten RNA durch Gelelektrophorese

Nach der Isolierung der cytoplasmatischen RNA wurde diese auf ein Agarosegel mit einem Zusatz von Formaldehyd aufgetragen. Formaldehyd dient bei der elektrophoretischen Auftrennung von RNA als denaturierendes Agens, das die Ausbildung von Sekundärstrukturen unterdrückt. Diese würden das Wanderungsverhalten der RNA-Moleküle während der Elektrophorese beeinflussen und bei der anschließenden Größenbestimmung zu verfälschten Ergebnissen führen.

2.3.2.1 Präparation des Formaldehyd-Gels

Zu 20 ml 10x FA Puffer (Zusammensetzung siehe unten) wurden 2,4 g Agarose (Serva, Heidelberg, Deutschland) gegeben. Diese Mischung wurde mit RNase-freiem Wasser auf 200 ml aufgefüllt, in einer Mikrowelle (Sharp, Mahwah, NJ, USA) kurz zum Kochen gebracht und anschließend im Wasserbad (Köttermann, Uetze-Hänigsen, Deutschland) auf 65 °C abgekühlt. Danach wurden 3,6 ml einer $12,3 \text{ mol l}^{-1}$ Formaldehydlösung (Riedel de Haën, Seelze, Deutschland) und 2 μl einer Ethidiumbromidlösung der Konzentration 10 mg ml^{-1} (Sigma, St. Louis, MO, USA) zugegeben. Die Mischung wurde auf einen Gelträger gegossen. Nach der Aushärtung wurde das Gel 30 Minuten in 1x FA Laufpuffer (Zusammensetzung siehe unten) inkubiert. Das zum Ansetzen der Puffer verwendete hochreine Wasser wurde 20 Minuten autoklaviert und war dadurch frei von RNasen.

Zusammensetzung der Puffer:**10x FA Puffer:**

200 mmol l ⁻¹	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure (MOPS) (Sigma)
50 mmol l ⁻¹	Natriumacetat (Fluka, Buchs, Schweiz)
10 mmol l ⁻¹	EDTA (Riedel de Haën)
pH = 7,0	

1x FA Laufpuffer:

100 ml	10x FA Puffer
20 ml	12,3 mol l ⁻¹ Formaldehyd (Riedel de Haën)
880 ml	RNase-freies Wasser

2.3.2.2 Präparation der RNA-Proben für die Gelelektrophorese

40 µl der aufgereinigten RNA in Wasser (siehe 2.3.1) wurden mit 10 µl 5x Gelbeladungspuffer (Zusammensetzung siehe unten) versetzt. Diese Mischung wurde 5 Minuten bei 65 °C im Thermoblock (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) denaturiert und anschließend 3 Minuten auf Eis abgekühlt, bevor die Proben auf das Gel (siehe 2.3.2.1) aufgetragen wurden.

5x Gelbeladungspuffer:

16 µl	gesättigte Bromphenolblaulösung (Merck, Darmstadt, Deutschland)
80 µl	500 mmol l ⁻¹ EDTA (Riedel de Haën, Seelze, Deutschland) pH 8,0
720 µl	12,3 mol l ⁻¹ Formaldehyd (Riedel de Haën)
2 ml	100 % Glycerin (Merck)
3084 µl	Formamid (Merck)
4 ml	10x FA Puffer (siehe 2.3.2.1)

Die Mischung wurde mit RNase-freiem Wasser (siehe 2.3.2.1) auf 10 ml aufgefüllt.

2.3.2.3 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese zur Auftrennung der isolierten cytoplasmatischen RNA wurde 3,5 Stunden bei einer Spannung von 7 V cm^{-1} in 1x FA Laufpuffer (siehe 2.3.2.1) durchgeführt. Auf das Gel wurden zusätzlich 3 μl eines RNA-Molekulargewichtsstandards mit einem Größenbereich von 0,24 kb bis 9,5 kb (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Belichtung fotografiert.

2.3.3 Transfer der RNA auf eine Hybond-N-Membran (Northern Blot)

Im Anschluss an die Elektrophorese wurde die aufgetrennte RNA aus dem Gel auf eine Hybond-N-Membran (Amersham, Little Chalfont, UK) transferiert (vergleiche Abb. 2.3.1). Dazu wurde eine Glasplatte mit einem Streifen Saugpappe (Whatman, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) bedeckt, der mit 20x SSC-Lösung (Zusammen-

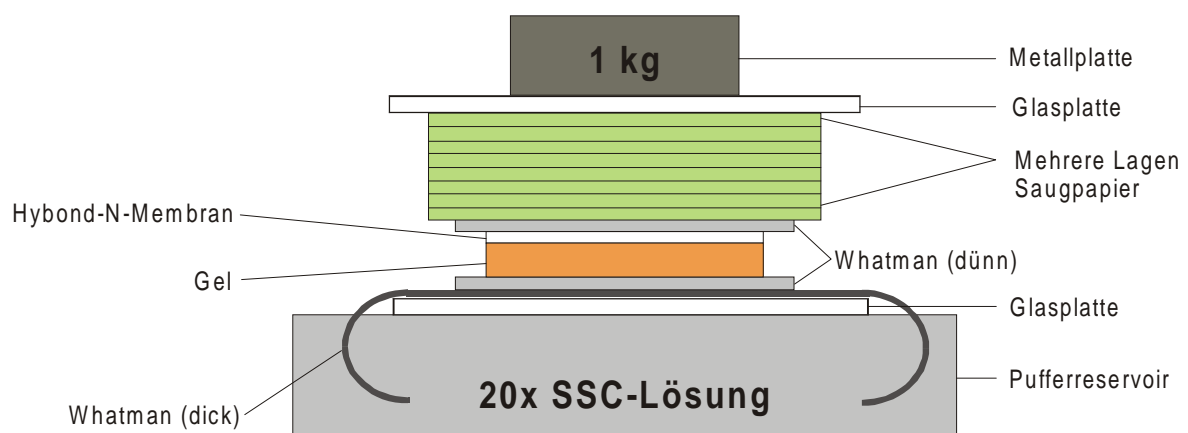


Abb. 2.3.1.: Aufbau des Northern-Blot-Transfers

setzung siehe unten) befeuchtet worden war. Die überhängenden Enden der Saugpappe befanden sich dabei in einem mit 20x SSC-Lösung gefüllten Pufferreservoir. Auf die Saugpappe wurde ein ebenfalls mit 20x SSC angefeuchtetes Stück Saugpapier (Whatman) gegeben, dessen Fläche ungefähr derjenigen des Gels entsprach; darauf wurde dann das Gel mit der Unterseite nach oben gelegt. Auf dem Gel wurde

dann die Hybond-N-Membran angebracht, wobei die Position der Geltaschen mit Bleistift auf der Membran eingezeichnet wurden. Über die Hybond-N-Membran wurde ein weiteres Stück Saugpapier (Whatman) und darüber mehrere Lagen Papiertücher (Tork, SCA, Mainz, Deutschland) gelegt. Eine Metallplatte mit einem Gewicht von 1 kg diente zur Beschwerung. Durch die Kapillarkräfte wurde ständig 20x SSC-Lösung aus dem Pufferreservoir gesaugt und dadurch die RNA auf die Hybond-N-Membran transferiert. Die auf die Membran übertragenen RNA-Moleküle wurden durch Bestrahlung mit UV-Licht ($1200 \mu\text{J cm}^{-2}$, UV Stratalinker 2400, Stratagene, La Jolla, CA, USA) kovalent mit der Membran gekoppelt und damit fixiert. Die Membranen wurden anschließend bei 4 °C aufbewahrt.

20x SSC-Lösung:

3 mol l⁻¹ Natriumchlorid (Riedel de Haën, Seelze, Deutschland)

0,3 mol l⁻¹ Tri-Natriumcitrat (Merck, Darmstadt, Deutschland)

pH = 7,0

2.3.4 Herstellung einer DNA-Sonde aus doppelsträngiger DNA durch Random Priming

Zum Nachweis der mRNA, die aus der Transkription des PYC2-Gens hervorgegangen ist, wurde zunächst eine Sonde aus einem Abschnitt des für PYC2 codierenden Gens hergestellt. Mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Nsi*I wurde ein Fragment mit einer Größe von 635 bp aus dem PYC2-Gen geschnitten. Anschließend wurde das Fragment auf einem einprozentigen Agarosegel präparativ aufgetrennt und unter UV-Beleuchtung mit einem Skalpell aus dem Gel getrennt. Mit dem kommerziell erhältlichen Kit JETsorb (Genomed, Bad Oeynhausen, Deutschland) wurde das Fragment aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt. Die Durchführung dieser Aufreinigung erfolgte nach den Vorschriften des Herstellers. Nach der Aufreinigung wurde durch Elektrophorese auf einem Agarosegel und anschließender UV-Beleuchtung des Gels die Reinheit des Fragments überprüft und außerdem dessen Konzentration durch

Vergleich mit einem DNA-Molekulargewichtsstandard (DNA Molecular Weight Marker III, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) ermittelt. Für die radioaktive Markierung des Fragments wurden 25 ng DNA eingesetzt. Die DNA wurde 5 Minuten bei 95 °C im Thermoblock (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) denaturiert, 3 Minuten auf Eis abgekühlt und weitere 3 Minuten bei 37 °C vorgewärmt. Zur radioaktiven Markierung der DNA wurde folgende Reaktionsmischung angesetzt, die - wenn nicht anders angegeben - aus dem Random Prime Kit von Promega (Madison, WI, USA) bestand:

28 µl	denaturiertes DNA-Fragment (entsprechend 25 ng DNA)
16 µl	Reaktionsmix (Zusammensetzung siehe unten)
5 µl	[α - ³² P] dATP (Amersham, Braunschweig, Deutschland)
1 µl	Klenow-Enzym (entsprechend 5 Enzymeinheiten (units,U, siehe unten))
<hr/>	
50 µl	Gesamtvolumen

Als Enzymeinheit ist diejenige Menge eines Restriktionsenzym definiert, die in der Lage ist, bei für das jeweilige Restriktionsenzym optimalen Puffer- und Temperaturbedingungen 1 µg DNA in einer Stunde vollständig zu spalten (Ibelgaufs, 1993).

Reaktionsmix:

15 µl	5x Labelling Puffer
3 x 2 µl	dNTPs (jeweils 20 µmol l ⁻¹)
2 µl	BSA-Lösung (400 µg l ⁻¹)

Die Reaktion zur radioaktiven Markierung des DNA-Fragments wurde 30 Minuten bei 37 °C im Thermoblock (Eppendorf) durchgeführt. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 1 µl 0,5 mol l⁻¹ EDTA-Lösung (Riedel de Haën, Seelze, Deutschland) und 1 µl denaturierte Heringsperma-DNA der Konzentration 10 mg ml⁻¹ zugegeben. Anschließend wurden die dNTPs, die nicht an der Reaktion teilgenommen haben, aus der

Reaktionsmischung entfernt. Dazu wurde die Reaktionsmischung über eine NAPTM-5-Säule (Pharmacia, Uppsala, Schweden) gereinigt. Diese Säule hält Desoxyribonucleotide zurück, Oligonucleotide können jedoch eluieren. Vor der Aufreinigung der Reaktionsmischung wurde die NAPTM-5-Säule mit 10 ml TES-Puffer (Zusammensetzung siehe unten) äquilibriert.

TES-Puffer:

50 mmol l ⁻¹	Tris (Sigma, St. Louis, MO, USA)
1 mmol l ⁻¹	EDTA (Riedel de Haën)
100 mmol l ⁻¹	NaCl (Riedel de Haën)
pH = 7,0	

Die Reaktionsmischung wurde anschließend auf die äquilibrierte Säule gegeben und mit 4 ml TES-Puffer eluiert. Dabei wurden 8 Fraktionen zu je 500 µl aufgefangen. Aus jeder Fraktion wurden 5 µl in ein Scintillationsröhrchen (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA) gefüllt, mit 250 µl Scintillationscocktail (Rotiszint, Roth, Karlsruhe, Deutschland) versetzt und im Szintillationsmessgerät (Wallac 1409 Liquid Szintillation Counter, Wallac, Freiburg, Deutschland) gemessen. Die vierte Fraktion war diejenige mit der höchsten Radioaktivität, sie enthielt demnach die meisten Oligonucleotide. Die in dieser Fraktion befindliche DNA wurde als Sonde bei der Hybridisierung eingesetzt und zunächst bei -20 °C gelagert.

2.3.5 Kontrollsonde aus β-Actin-DNA

Alle Eukaryontenspezies enthalten Actin. Es stellt in einer Eukaryontenzelle den Hauptanteil der Cytoskelettproteine dar (Alberts et al., 1990). In Säugerzellen liegen sechs Isoformen des Actins vor: vier Isoformen im Muskel und zwei Isoformen im Cytoplasma (Vandekerckhove und Weber, 1979). Die Isoformen des Actins im Muskel und im Cytoplasma unterscheiden sich jedoch lediglich in weniger als 7 % ihrer Aminosäuren (Alberts et al., 1990). Zur positiven Kontrolle bei der Durchführung der

Northern-Hybridisierungen wurde eine Sonde aus der DNA, die für murines β -Actin codiert, hergestellt, da auch CHO DG44 als Eukaryonten mRNA zur Translation von Actin enthalten. Nach der Hybridisierung der RNA-Blots (siehe 2.3.3) mit der β -Actin-Sonde muss die anschließende Autoradiographie ein Signal für das Vorhandensein von β -Actin-mRNA zeigen. Beim Fehlen dieses Signals müssten die Bedingungen bei der Herstellung der Blots (siehe 2.3.3) oder bei der Hybridisierung verändert werden. Zur Herstellung der β -Actin-Sonde wurde aus dem Plasmid pm-beta-Actin (Leader et al., 1986), das von Dr. Manfred Wirth (GBF, Abteilung Regulation und Differenzierung, Braunschweig, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurde, das für β -Actin codierende Gen herausgeschnitten. Das Plasmid wurde dazu einem Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* unterzogen. Nach anschließender elektrophoretischer Trennung auf einem einprozentigen Agarosegel wurde das β -Actin-Fragment mit der Größe von 1,3 kb unter UV-Belichtung mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Das DNA-Fragment wurde mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Kits JETsorb (Genomed, Bad Oeynhausen, Deutschland) nach den Vorschriften des Herstellers aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt. Die β -Actin-Sonde wurde durch Random Priming (siehe 2.3.4) hergestellt und bis zur Hybridisierung bei -20 °C gelagert.

2.3.6 Hybridisierung der RNA-Blots

Die Hybridisierung der Northern Blots wurde nach der Vorschrift des Herstellers von Hybond-N-Membranen (Amersham, Little Chalfont, UK) durchgeführt.

Die Blots wurden zunächst in ein Hybridisierungsgefäß (Stratagene, La Jolla, CA, USA) gelegt und mit 25 ml Vorhybridisierungslösung (Zusammensetzung siehe unten) versetzt. Die Vorhybridisierung fand 4 Stunden bei 42 °C statt (Hybridizer 600, Stratagene). Die Sonde wurde vor der Hybridisierung 3 Minuten bei 95 °C denaturiert (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Anschließend wurden 10 ml der Vorhybridisierungslösung entnommen, verworfen und die denaturierte Sonde wurde zur Vorhybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung fand über Nacht bei

42 °C statt. Anschließend wurden die Blots in folgender Reihenfolge gewaschen:

1. 15 Minuten bei 42 °C mit 50 ml 6x SSC-Lösung (siehe unten)
2. 30 Minuten bei 42 °C mit 50 ml einer 2x SSC-Lösung, die 0,1 % SDS (Merck, Darmstadt, Deutschland) enthielt
3. 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 50 ml einer 0,2x SSC-Lösung, die 0,1 % SDS enthielt

Nach dem Waschen erfolgte das Trocknen der Blots. Zur Autoradiographie wurden die Blots auf einem Film (BioMax, Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) 5 Tage bei -70 °C gelagert.

Zusammensetzung der verwendeten Lösungen:

Vorhybridisierungslösung:

15 ml	20x SSC-Lösung (siehe 2.3.3)
25 ml	deionisiertes Formamid (Merck)
2,5 ml	100x Denhardt-Lösung (siehe unten)
0,5 ml	10 % SDS (Merck)
0,25 ml	10 mg ml ⁻¹ denaturierte Heringsperma-DNA
6,75 ml	hochreines, RNase-freies Wasser

50 ml	Gesamtvolumen
-------	---------------

SSC-Lösung:

Die verwendeten SSC-Lösungen wurden durch entsprechende Verdünnung aus einer 20x SSC-Lösung (siehe 2.3.3) hergestellt.

100x Denhardt-Lösung:

2 %	BSA (Sigma, St. Louis, MO, USA)
2 %	Ficoll 400 (Sigma)
2 %	Polyvinylpyrrolidon (Sigma)

2.3.7 Hybridisierung der Northern-Blots mit einzelsträngigen Sonden

Zum Nachweis der Transkription von PYC2 in mit pCMVSHE-PYC2 transfizierten CHO DG44/D3-Zellen wurden zusätzlich zu der aus doppelsträngiger DNA hergestellten Sonde (siehe 2.3.4) einzelsträngige Oligonucleotide als Sonde verwendet. Die Hybridisierung der RNA-Blots mit der Sonde aus doppelsträngiger DNA ergab unterschiedlich große Transkripte (siehe 3.1.2). Zur genaueren Untersuchung dieser Transkripte wurden einzelsträngige Oligonucleotide als Sonden eingesetzt (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland), deren Sequenzen mit Teilen aus dem für PYC2 codierenden Gen identisch sind. Zwei Oligonucleotide sind komplementär zum codierenden Strang (Hyb-1 und Hyb-2), die anderen beiden Oligonucleotide sind komplementär zu Hyb-1 und Hyb-2 und damit auch zum nicht-codierenden Strang aus dem PYC2-codierenden Gen. Diese Oligonucleotide tragen die Bezeichnungen Non-Hyb-1 und Non-Hyb-2. Die vier Oligonucleotide haben folgende Sequenzen (von 5' nach 3'):

Hyb-1:	CAG AAA TTG TCC CTA AGA CC
Hyb-2:	AGT CTT ACC TTG TTC GAT GG
Non-Hyb-1:	GGT CTT AGG GAC AAT TTC TG
Non-Hyb-2:	CCA TCG AAC AAG GTA AGA CT

Werden einzelsträngige Oligonucleotide mit einer Größe von weniger als 40 Basen als Sonde eingesetzt, sollte die Hybridisierungstemperatur T_{Hyb} 5 °C unter der Schmelztemperatur T_m liegen (Ibelgafts, 1993).

Bei Oligonucleotiden dieser Größe kann T_m annähernd durch folgende Formel errechnet werden (Ibelgafts, 1993):

$$T_m = (A + T) \times 2 \text{ }^{\circ}\text{C} + (G + C) \times 4 \text{ }^{\circ}\text{C} \quad (2.3.1)$$

mit

A: Anzahl der Adeninmoleküle im Oligonucleotid

T: Anzahl der Thyminmoleküle im Oligonucleotid

G: Anzahl der Guaninmoleküle im Oligonucleotid

C: Anzahl der Cytosinmoleküle im Oligonucleotid

Daraus ergeben sich folgende Hybridisierungstemperaturen:

Hyb-1: $T_{\text{Hyb}} = 55 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Hyb-2: $T_{\text{Hyb}} = 53 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Non-Hyb-1: $T_{\text{Hyb}} = 53 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Non-Hyb-2: $T_{\text{Hyb}} = 53 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Die RNA-Blots wurden jeweils bei den oben angegebenen Hybridisierungstemperaturen 4 Stunden wie unter 2.3.5 beschrieben vorhybridisiert. Zur radioaktiven Markierung der Oligonucleotide wurden diese am 5'-Ende mit [^{32}P]- γ -ATP phosphoryliert. Dazu wurden folgende Reagenzien zusammengegeben (Dr. Joop van den Heuvel, GBF, Arbeitsgruppe Mikrobielle Systeme, Braunschweig, persönliche Mitteilung):

1 μl	Oligonucleotid-Lösung (5 pmol μl^{-1})
1 μl	10x Kinase-Puffer (Zusammensetzung siehe unten)
5,5 μl	MilliQ- H_2O
1 μl	PNK 2,5 U μl^{-1} (New England Biolabs, Schwalbach, Deutschland)
1,5 μl	[^{32}P] γ -ATP (Amersham, Braunschweig, Deutschland)
<hr/>	
10 μl	Gesamtvolumen

10x Kinase-Puffer:

660 mmol l ⁻¹	Tris-HCl, pH = 7,6 (Sigma, St. Louis, MO, USA)
110 mmol l ⁻¹	MgCl ₂ (Merck, Darmstadt, Deutschland)
2 mg ml ⁻¹	Gelatine (Sigma)

Nach dem Mischen der Reagenzien wurde der Ansatz 60 Minuten bei 37 °C im Thermoblock (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Danach wurde [³²P] γ-ATP, das nicht von der Kinase eingebaut wurde, durch Trennung über eine NAPTM-5-Säule (Pharmacia, Uppsala, Schweden) entfernt. Die Durchführung erfolgte wie in 2.3.4 beschrieben. Die Fraktion, die die radioaktiv markierten Oligonucleotide enthielt, wurde zum Vorhybridisierungsansatz gegeben. Die Inkubation der Blots erfolgte in dieser Lösung über Nacht. Anschließend wurden die Blots zunächst dreimal 10 Minuten bei Raumtemperatur in 6x SSC-Lösung, die 0,1 % SDS enthielt, gewaschen und schließlich einmal 2 Minuten bei Raumtemperatur in 2x SSC-Lösung, die 0,1 % SDS enthielt. Die Blots wurden abschließend getrocknet und zur Autoradiographie auf einem Film (BioMax, Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) 5 Tage bei -70 °C gelagert.

2.4 Amplifikation von Plasmiden in *Escherichia coli* und Transfektion von Säugerzelllinien

Um Plasmide in ausreichenden Mengen für die Transfektion von Säugerzelllinien zu erhalten oder um bakterielle Glycerinkulturen anzulegen, wurden *E. coli* mit dem entsprechenden Plasmid transformiert.

2.4.1 Transformation von kompetenten *Escherichia coli* mit Plasmid-DNA durch Elektroporation

Als kompetent werden Bakterienzellen bezeichnet, die durch eine Vorbehandlung mit Glycerin in der Lage sind, Fremd-DNA aufzunehmen. Transformation bezeichnet den Vorgang der Einschleusung von Fremd-DNA in die Bakterienzelle durch die Plasmamembran hindurch. Beim Elektroporationsverfahren werden die Zellmembranen der in Suspension befindlichen Empfängerzellen durch kurze elektrische Pulse hoher Feldstärke für hochmolekulare Moleküle permeabilisiert.

40 µl kompetente *E. coli* (Arbeitsgruppe Mikrobielle Systeme, GBF, Braunschweig) wurden auf Eis aufgetaut. Die benötigten Transformationsküvetten (Bio-Rad, München, Deutschland) wurden auf Eis vorgekühlt. 1 µl Plasmid-DNA mit einer Konzentration von 1 ng µl⁻¹ wurde auf den unteren Rand einer Transformationsküvette gegeben. Mit der aufgetauten 40 µl Bakteriensuspension wurde die Plasmid-DNA auf den Küvettenboden gespült. Anschließend erfolgte die Transformation mit dem Gene Pulser II (Bio-Rad) und dem Pulse Controller (Bio-Rad). Dazu wurden folgende Parameter eingestellt:

Kapazität:	500 µF
Widerstand:	200 Ω
Spannung:	2,5 kV

Die sich beim Transformationsvorgang einstellende Zeitkonstante sollte im Bereich von 4 ms bis 4,5 ms liegen. Unmittelbar nach der Transformation wurden die Bakterien mit 1 ml LB-Medium versetzt und in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt. Es folgte eine einstündige Inkubation dieser Suspension bei 37 °C im Thermomixer (Eppendorf). Anschließend wurden von dieser Suspension 10 µl, 50 µl und 100 µl auf je einer Petrischale (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) mit LB-Selektionsagar ausgestrichen. Der Selektionsagar enthielt in Abhängigkeit von dem Resistenzgen auf dem Plasmid Ampicillin oder Tetracyclin. Die Petrischalen mit den ausplattierten *E. coli* wurden über Nacht bei 37 °C im Brutraum inkubiert. Zur Kontrolle wurden ebenfalls untransformierte, kompetente *E. coli* ausplattiert. Konnten diese Bakterien auf dem Selektionsagar wachsen, zeigte dieses den

Zerfall des Antibiotikums.

2.4.2 Isolierung der Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

2.4.2.1 Minipräparationen

Zur schnellen Überprüfung einer Transformation von *E. coli* wurden Minipräparationen von Plasmid-DNA nach folgender Vorgehensweise durchgeführt:

2 ml LB-Selektionsmedium wurden in ein steriles Kapsenberg-Kulturröhrchen (Schott, Mainz, Deutschland) gefüllt. Von einer Petrischale mit Selektionsagar wurde eine Einzelkolonie von *E. coli* mit einem sterilen Zahnstocher entnommen, auf einer neuen Petrischale mit LB-Selektionsagar abgestrichen und dann in das Kapsenberg-Röhrchen gegeben. Für die Minipräparation wurde dieses Röhrchen über Nacht bei 37 °C im Brutraum inkubiert, ebenso als Reserve die Petrischale mit dem Abstrich der *E. coli* Einzelkolonie. Nach der Kultivierung wurde der Inhalt des Kapsenberg-Kulturröhrchens in ein steriles 2 ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt und 3 Minuten bei Raumtemperatur und 10000 Upm (Zentrifuge 5415C, Eppendorf) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl Lösung I (Zusammensetzung siehe unten) aufgenommen und 5 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt (Vortex Genie 2, Bender & Hobein, Zürich, Schweiz). Anschließend wurden 200 µl unmittelbar vor dem Experiment angesetzte Lösung II (Zusammensetzung siehe unten) zugegeben. Der Ansatz wurde 5 Minuten auf Eis gekühlt. Hiernach wurden 150 µl 7,5 mol l⁻¹ Ammoniumacetatlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) zugesetzt. Dieser Ansatz wurde 10 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur und 12000 Upm zentrifugiert (Zentrifuge 5415C). Der Überstand wurde in ein steriles 2 ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und mit 0,7 Volumenanteilen 2-Propanol (J. T. Baker, Griesheim, Deutschland) gemischt. Diese Mischung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach 15 Minuten bei Raumtemperatur und 12000 Upm zentrifugiert (Zentrifuge 5415C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 70 %-igem Ethanol (J. T. Baker) gewaschen. Es folgte eine Zentrifugation von 3 Minuten bei Raumtemperatur und 12000 Upm (Zentrifuge 5415C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 µl TE-

Puffer pH 8,0 (Zusammensetzung siehe unten) aufgenommen. Der Lösung wurden 2 µl RNase (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) zugesetzt und die Minipräparation wurde bei -20 °C gelagert.

Lösung I:

50 mmol l ⁻¹	D-Glucose-Monohydrat (Riedel de Haën, Seelze, Deutschland)
25 mmol l ⁻¹	Tris pH 8,0 (Sigma, St. Louis, MO, USA)
10 mmol l ⁻¹	EDTA (Riedel de Haën)

Lösung II:

0,2 mol l ⁻¹	NaOH (Merck)
1 %	SDS (Merck)

TE-Puffer:

10 mmol l ⁻¹	Tris pH 8,0 (Sigma)
1 mmol l ⁻¹	EDTA (Riedel de Haën)

2.4.2.2 Maxipräparationen

Zur Aufreinigung größerer Mengen von Plasmid-DNA (z. B. für die Transfektion von Säugerzellen) wurden Maxipräparationen durchgeführt. 300 ml LB-Selektionsmedium wurden in einen 2 l-Kolben (Schott, Mainz, Deutschland) gefüllt. 2 ml einer *E. coli*-Vorkultur wurden hinzugegeben und es folgte eine Kultivierung des Ansatzes über Nacht bei 37 °C im Brutraum. Aus dieser Suspensionskultur wurden Maxipräparationen von Plasmid-DNA mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Kits JETstar (Genomed, Bad Oeynhausen, Deutschland) nach der Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Die Methode basiert ebenso wie die Minipräparation (siehe 2.4.2.1) auf der konventionellen alkalischen Lyse von Bakterienzellen, bei der die chromosomale DNA denaturiert wird, die Plasmid-DNA jedoch intakt bleibt. Nach der anschließenden Neutralisation wird die unlösliche chromosomale DNA durch Zentrifugation entfernt, die Plasmid-DNA bleibt im Überstand. Über eine Anionenaustauscher-Säule wird die Plasmid-DNA

präparativ aufgereinigt und in TE-Puffer mit pH = 8,0 (siehe 2.4.2.1) bei -20 °C gelagert.

2.4.2.3 Restriktionsanalyse der isolierten Plasmid-DNA

Zur Überprüfung der durch Mini- und Maxipräparation aufgereinigten Plasmid-DNA wurde diese mit Restriktionsenzymen (New England Biolabs, Schwalbach, Deutschland) geschnitten und die erhaltenen Fragmente durch Elektrophorese aufgetrennt. Die Analyse der Plasmidpräparation erfolgte durch Vergleich dieser Fragmente mit der Genkarte des Plasmids. Von Bedeutung ist die Restriktionsanalyse vor allem zur Kontrolle einer Ligation, da hierbei eine DNA-Insertion auf ihre Orientierung überprüft werden muss.

2.4.2.3.1 Restriktionsanalyse

Zu 2 µl unverdünnter Minipräparation oder 2 µl 1:10 verdünnter Maxipräparation in einem sterilen 1,5 ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurden 10 Enzymeinheiten (units, U, siehe 2.3.4) Restriktionsenzym, 1/10 des Gesamtvolumens 10x Restriktionspuffer (New England Biolabs) und als Restvolumen hochreines Wasser gegeben. Der Reaktionsansatz wurde eine Stunde bei dem für das jeweilige Restriktionsenzym angegebenen Temperaturoptimum inkubiert (Thermomixer 5436, Eppendorf). Danach wurde 6x Gelbeladungspuffer (siehe 2.4.2.3.2) zugegeben, so dass er im Gesamtvolumen einfach konzentriert vorlag. Die Mischung wurde anschließend in einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt (siehe 2.4.2.3.3). Anhand eines mitgelaufenen DNA-Molekulargewichtsstandards (Längenstandard III, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) erfolgte die Überprüfung auf Richtigkeit der DNA-Banden unter UV-Licht (Herolab E.A.S.Y. RH-3, Wiesloch, Deutschland).

2.4.2.3.2 Gelbeladungspuffer

Der bei der Elektrophorese von DNA eingesetzte Gelbeladungspuffer erhöht die Dichte der DNA-Probe und erleichtert dadurch die Beladung des Gels. Zudem wan-

dern die Farbstoffe des Puffers mit DNA-Fragmenten einer bestimmten Länge, so dass der Verlauf der Elektrophorese kontrolliert werden kann. Bromphenolblau wandert dabei mit DNA-Fragmenten einer Länge von ungefähr 100 bp und markiert daher die Elektrophoresefront. Xylencyanol wandert mit DNA-Fragmenten einer Länge von ungefähr 5000 bp und markiert bei der Elektrophorese den Mittelbereich. Bei den DNA-Gelelektrophoresen wurde nach Maniatis et al. (1982) ein sechsfach konzentrierter Gelbeladungspuffer mit folgender Zusammensetzung verwendet:

0,25 %	Bromphenolblau (Serva, Heidelberg, Deutschland)
0,25 %	Xylencyanol (Serva)
40 %	Sucrose (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Diese drei Substanzen wurden in hochreinem Wasser gelöst. Der Gelbeladungspuffer wurde der aufzutrennenden DNA-Probe in der Menge zugesetzt, dass er im Endvolumen einfach konzentriert vorlag.

2.4.2.3.3 Agarosegele

Alle DNA-Elektrophoresen wurden mit 1 %-igen Agarosegelen durchgeführt. Zur Herstellung von kleinen Gelen wurden 0,3 g Agarose (Serva) mit 30 ml TAE-Laufpuffer (siehe 2.4.2.3.4) in eine Glasflasche (Schott, Mainz, Deutschland) gegeben; zur Herstellung von großen Gelen wurden 1 g Agarose mit 100 ml TAE-Laufpuffer zusammengegeben. Die Mischung wurde in einem Mikrowellenofen (Sharp, Mahwah, NJ, USA) kurz aufgekocht. Es folgte eine Abkühlung der Agaroselösung in einem Wasserbad (Köttermann, Uetze-Hänigsen, Deutschland) auf 50 °C, danach wurden 1,5 µl aus einer Ethidiumbromidlösung (Sigma) der Konzentration 10 mg ml⁻¹ zugegeben, so dass in der Agaroselösung Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg l⁻¹ vorlag. Die ethidiumbromidhaltige Agaroselösung wurde dann auf den Gelträger mit Kamm gegossen und härtete binnen einer halben Stunde aus.

2.4.2.3.4 Elektrophorese

Die Elektrophoresen mit kleinen Gelen wurden in einer Minigel-Elektrophoresekammer (BioPlex, Strehlau & Kruse, Freiburg, Deutschland) durchgeführt, Elektrophoresen mit großen Gelen in einer DNA-Sub-Cell-Elektrophoresekammer (Bio-Rad, München, Deutschland). Zum TAE-Laufpuffer (siehe unten) wurde Ethidiumbromid aus einer Stammlösung (siehe 2.4.2.3.3) zu einer Konzentration von $0,5 \mu\text{g l}^{-1}$ gegeben. Die Elektrophoresekammer wurde mit dem ethidiumbromidhaltigen TAE-Laufpuffer gefüllt, so dass die Oberfläche des Gels vollständig mit Laufpuffer bedeckt war. Über ein Spannungsgerät (LKB 2297 Macro-Drive 5, Pharmacia, Uppsala, Schweden) wurde eine Spannung von 4 V pro cm Gellänge angelegt. Die Elektrophorese erfolgte bis zur Elution der Bromphenolblaubande am Rand des Gels.

50x TAE-Laufpuffer (Stammlösung):

242 g	TRIZMA Base (Sigma)
57,1 ml	Eisessigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)
100 ml	$0,5 \text{ mol l}^{-1}$ EDTA pH 8 (Riedel de Haën)
Restvolumen	hochreines Wasser
<hr/>	
1000 ml	Gesamtvolumen

2.4.3 Transfektion von Säugerzelllinien mit Plasmid-DNA

Zur Transfektion der Zelllinie CHO DG44/D3 mit Plasmid-DNA wurde der kommerziell erhältliche Kit LipofectAMINE PLUS (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. LipofectAMINE ist eine Mischung aus kationischen Lipidmolekülen, die in wässriger Lösung positiv geladene Liposomen bilden. Diese entwickeln mit negativ geladener DNA Liposomen-Nucleinsäure-Komplexe. Bei der Transfektion von Säugerzellen adsorbieren die Liposomen-Nucleinsäure-Komplexe an die Zelloberfläche, fusionieren mit der Plasmamembran und transferieren so die DNA in das Cytoplasma.

Die Transfektionsmethode mit LipofectAMINE PLUS wurde, basierend auf der Vorschrift des Herstellers, für die Transfektion von CHO DG44/D3 in T-25-Flaschen optimiert.

Einen Tag vor der Transfektion wurden die zu transfizierenden CHO DG44/D3 in einer T-25-Flasche so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 50 % bis 80 % erreicht hatten. In einem sterilen 1,5 ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurden 300 µl MEM Alpha Basalmedium mit Nucleosiden (siehe 2.1.2.1.1) gegeben. 5 µg Transfer-DNA, 5 µg Carrier-DNA (Promega, Madison, WI, USA) und 0,5 µg Selektions-DNA wurden zugegeben, ebenso 20 µl PLUS-Reagenz. Der Ansatz wurde kurz geschüttelt (Vortex Genie 2, Bender & Hobain, Zürich, Schweiz) und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In einem weiteren sterilen 1,5-ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) wurden 300 µl nucleosidhaltiges MEM Alpha Basalmedium und 25 µl LipofectAMINE gemischt. Nach der Inkubation wurde die DNA-PLUS-Lösung zugegeben, und der Ansatz wurde durch kurzes Schütteln (Vortex Genie 2) vermischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Unterdessen wurde der Kulturüberstand der zu transfizierenden Zellen in der T-25-Flasche abgesaugt und durch 2,5 ml MEM Alpha Basalmedium mit Nucleosiden ersetzt. Es folgte die Zugabe der DNA-PLUS-LipofectAMINE-Komplexe zu den Zellen in die T-25-Flasche. Der Ansatz wurde 3 Stunden bei 37 °C und 5,5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden 3,9 ml MEM Alpha NOVO High Glucose (siehe 2.1.2.1.2) und 155 µl FCS in die T-25-Flasche gefüllt. Nach einem Tag Inkubation bei 37 °C und 5,5 % CO₂ wurde ein Medienwechsel mit 7 ml MEM Alpha NOVO High Glucose durchgeführt. Nach weiteren 48 Stunden Inkubation bei 37 °C und 5,5 % CO₂ wurde die Selektion begonnen. Die Zellen wurden mit Trypsin abgelöst und in Petrischalen mit 50 cm² Wachstumsfläche (Bibby, Dunn, Asbach, Deutschland), die 15 ml Selektionsmedium enthielten, umgesetzt. Nach ungefähr 5 Tagen bildeten sich Zellklone, die isoliert und subkloniert wurden (siehe 2.1.3.1.3).

2.5 Berechnete Größen

2.5.1 Spezifische Wachstumsrate

Die spezifische Wachstumsrate μ wurde wie folgt berechnet: (Chmiel, 1991a):

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \quad [\text{h}^{-1}] \quad (2.5.1)$$

t_1, t_2 Zeitpunkte 1 bzw. 2 [s]

X_1, X_2 Zellkonzentrationen zum Zeitpunkt t_1 bzw. t_2 [l^{-1}]

2.5.2 Produktbildungs- und Substratverbrauchsrate

Bei diskontinuierlichen Kultivierungen wurden die Produktbildungs- bzw. Substratverbrauchsrate nach Kratje und Lincoln (1992) berechnet:

Volumetrisch:

$$C_{\text{si}} = \frac{c_1 - c_2}{t_2 - t_1} \quad [\text{mol l}^{-1} \text{s}^{-1}] \quad (2.5.2)$$

Zellspezifisch:

$$C_{\text{si,X}} = \frac{c_1 - c_2}{(t_2 - t_1) \times \sqrt{X_1 \times X_2}} \quad [\text{mol s}^{-1}] \quad (2.5.3)$$

C_{si}	Volumetrische Produktbildungs- bzw. Substratverbrauchsrate
$C_{si, X}$	Zellspezifische Produktbildungs- bzw. Substratverbrauchsrate
c_1	Substrat- bzw. Produktkonzentration zum Zeitpunkt t_1
c_2	Substrat- bzw. Produktkonzentration zum Zeitpunkt t_2
t_1, t_2	Zeitpunkte 1 bzw. 2 [s]
X_1, X_2	Zellkonzentrationen zum Zeitpunkt t_1 bzw. t_2 [l^{-1}]

2.5.3 Kennzahlen aus den Nukleotidpools von Säugerzellen

Der NTP-Wert beschreibt das Verhältnis zwischen den Summen der Purin- und Pyrimidintriphosphate:

$$NTP = \frac{ATP + GTP}{UTP + CTP} \quad (2.5.4)$$

Der U-Wert gibt das Verhältnis zwischen UTP und den beiden N-Acetylhexosaminen UDPGalNAc und UDPGlcNAc wieder:

$$U - Wert = \frac{UTP}{UDPGNAc} \quad (2.5.5)$$

Der NTP/U-Wert stellt den Quotienten aus NTP- und U-Wert dar:

$$NTP / U - Wert = \frac{NTP}{U} \quad (2.5.6)$$

3 Ergebnisse

3.1 Einführung der Pyruvat-Carboxylase 2 aus *Saccharomyces cerevisiae* in die Zelllinie CHO DG44/D3 und Selektion mit Geneticin

3.1.1 Transfektion und Selektion

Für die Transfektion der Zelllinie CHO DG44/D3 wurde zunächst die Methode der Calciumphosphat-Copräzipitation (Graham und van der Eb, 1973) verwendet. Bei dieser Methode wird die in die Zelle einzubringende rekombinante Plasmid-DNA zu einer Calciumchlorid-Lösung gegeben und anschließend mit einem Phosphatpuffer (*HEPES Buffered Saline*, HEBS) vermischt; es bildet sich ein feinkörniges DNA-Calciumphosphat-Präzipitat. Dieses Präzipitat wird auf die zu transfizierenden Zellen gegeben, die es anschließend durch Phagozytose aufnehmen (Koch-Brandt, 1993). Auf diese Weise gelangt die rekombinante DNA in die Zelle.

Bei dieser Methode ist die Größe der DNA-Calciumphosphat-Präzipitate entscheidend für die Effizienz der Transfektion. Der pH-Wert und die Temperatur beeinflussen die Präzipitatgröße maßgeblich. Selbst geringe Schwankungen dieser beiden Parameter wirken sich auf die Transfektionseffizienz aus, so dass eine Standardisierung der Calciumphosphat-Copräzipitation mit großen Schwierigkeiten verbunden ist.

Für die Transfektion der Zelllinie CHO DG44/D3 zeigte die Calciumphosphat-Copräzipitation keinen Erfolg, so dass eine andere Transfektionsmethode herangezogen werden musste. Als Alternative zum Gentransfer in die Zelllinie CHO DG44/D3 bot sich die Transfektion mit kationischen Liposomen (Lipofektion) an (Felgner und Ringold, 1987), da bei dieser Methode der Einfluss von pH-Wert und Temperatur auf die Transfektionseffizienz wesentlich geringer ist als bei der Calciumphosphat-Copräzipitation (Koch-Brandt, 1993). Basierend auf der Lipofektion wurde der Gentransfer mit LipofectAMINE PLUS (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt und für die Zelllinie CHO DG44/D3 optimiert. Die Methode ist in 2.4.3 ausführlich beschrieben.

Die DHFR-negative Zelllinie CHO DG44/D3 wurde mit den Plasmiden pCMVSHE-

PYC2 und pAG60 cotransfiziert. Diese Plasmide tragen das Gen für die Pyruvat-Carboxylase 2 (PYC2) aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* bzw. das Gen für die Resistenz gegen das Antibiotikum Geneticin (G418). Die transfizierten Zellen wurden durch Zugabe von Geneticin zum Kulturmedium selektioniert. Anschließend erfolgte die Isolierung von 20 Einzelklonen, die kultiviert und für weitere Untersuchungen kryopräserviert wurden.

Außerdem wurde die Zelllinie CHO DG44/D3 ausschließlich mit dem Plasmid pAG60 transfiziert. Nach der Selektion durch Zugabe von Geneticin zum Kulturmedium diente die resultierende Mischung der Einzelklone als Kontrolle für die folgenden Untersuchungen, da diese rekombinanten Zellen keine PYC2 enthalten, aber ebenfalls in geneticinhaltigem Kulturmedium wachsen können. Diese Zelllinie wird als CHO DG44/D3 pAG-MK bezeichnet (vergleiche 2.1.1.1.3).

3.1.2 Transkription der PYC2 in selektierten Zellklonen

Nach der Selektion der mit PYC2 transfizierten CHO-Zellen und der anschließenden Isolierung von Einzelklonen war zunächst die Überprüfung der Transkription des PYC2-Gens in diesen Klonen erforderlich. Zur RNA-Isolierung wurden drei PYC2-Klone, der untransfizierte Wildtyp sowie die Zelllinie CHO DG44/D3 pAG-MK, die das Resistenzgen gegen Geneticin trägt, ausgewählt.

Die Northern-Blot-Analyse erfolgte zunächst mit einer Sonde aus dem Plasmid pCMVSHE-PYC2 und dem Gen für β -Actin. Die Analytik ist in 2.3 ausführlich beschrieben. Abb. 3.1.1 zeigt das Resultat der Hybridisierung. In allen Bahnen ist ein starkes Signal der β -Actin-Sonde ersichtlich. Die Erkennung der β -Actin-mRNA diente als Positivkontrolle bei der Northern-Blot-Analytik, da β -Actin ein in allen Säugerzellen enthaltenes Protein ist. Außerdem zeigen alle Bahnen eine Bande bei ungefähr 2 kb, die zunächst nicht näher zugeordnet werden kann.

Das Hybridisierungsmuster der mit PYC2 transfizierten Klone (Bahnen 3-5) unterscheidet sich deutlich von demjenigen der nicht mit PYC2 transfizierten Zellen (Bahnen 1 und 2). Es weist Transkripte mit unterschiedlichen Konzentrationen und

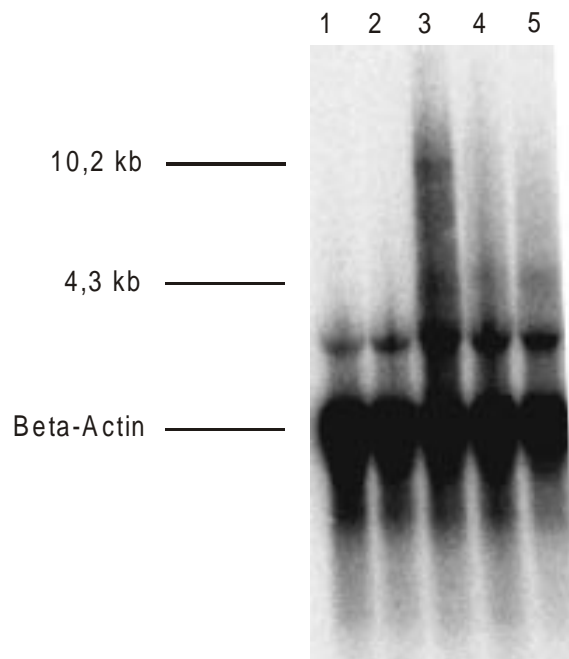


Abb. 3.1.1: Northern-Blot-Analyse der PYC2 aus der cytoplasmatischen RNA verschiedener Klone.

Bahn 1: CHO DG44/D3 MWCB (untransfizierter Wildtyp, Kontrolle)

Bahn 2: CHO DG44/D3 pAG-MK (Kontrolle)

Bahn 3: CHO DG44/D3 PYC2-B2

Bahn 4: CHO DG44/D3 PYC2-G2

Bahn 5: CHO DG44/D3 PYC2-F3

Fragmentlängen auf. So ist in den Bahnen 3-5 ein Signal bei 4,2 kb zu erkennen, in Bahn 3 ein Signal bei 10,2 kb. Da das PYC2-Gen aus 3573 bp besteht, wurde eine Fragmentlänge der PYC2-mRNA von 3,573 kb bzw. von 3,773 kb unter Berücksichtigung des Poly(A)-Schwanzes von ca. 200 bp erwartet. Die nicht mit PYC2 trans-

fizierten Zellen enthalten keine Transkripte dieser Fragmentlängen.

Diese Unterschiede im Hybridisierungsmuster zwischen mit PYC2 transfizierten und nicht mit PYC2 transfizierten Zellen verdeutlichen die Expression des PYC2-Gens auf mRNA-Ebene. Allerdings bleibt die Frage offen, warum der Klon CHO DG44/D3 PYC2-B2 ein Transkript mit einer Länge von 10,2 kb enthält.

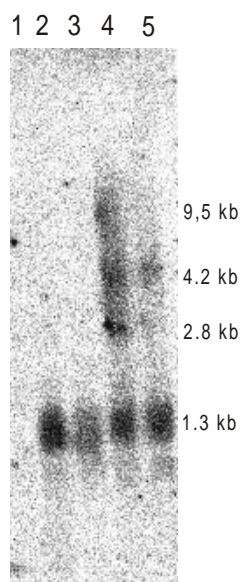
Zur Klärung dieser Frage erfolgte zunächst eine Sequenzierung des PYC2-Gens im Plasmid pCMVSHE-PYC2. Es sollte ausgeschlossen werden, dass durch eine Deletion oder eine Punktmutation das Stoppsignal in 3'-Richtung verschoben ist und damit nach der Transkription eine längere mRNA entsteht. Das Ergebnis der Sequenzierung ist im Anhang dieser Arbeit dargestellt. Die PYC2-codierende Region wurde von zwei Laboratorien sequenziert: Seqlab (Göttingen, Deutschland) und Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA). Die Resultate (pyc2_Seqlab und pyc2_EliLilly) sind im Vergleich zu PYC2-Sequenzen aufgezeigt, die in Datenbanken oder in der Literatur angegeben sind: pyc2_scybr218c (EMBL-Datenbank), pyc2_Stucka (Stucka et al., 1991) und pyc2_Val (Val et al., 1995). Diese drei in der Literatur angegebenen Sequenzen weisen einige Unterschiede auf. Aus dem Vergleich dieser Sequenzen mit den Ergebnissen von Seqlab und Eli Lilly ist ersichtlich, dass in keinem Fall Gemeinsamkeiten der Resultate pyc2_Seqlab und pyc2_EliLilly vorliegen, die sich von allen drei in der Literatur beschriebenen PYC2-Sequenzen unterscheiden. Von einer fehlerhaften Basenzusammensetzung des PYC2-Gens im Plasmid pCMVSHE-PYC2 wäre auszugehen, wenn eine von Seqlab und Eli Lilly ermittelte Base in allen drei in der Literatur beschriebenen Sequenzen an dieser Stelle des Gens einheitlich anders bestimmt ist. Dies trifft jedoch nicht zu; die von Seqlab und Eli Lilly festgestellte Basenzusammensetzung des PYC2-Gens ist mit mindestens einer der drei in der Literatur beschriebenen Sequenzen identisch. Es liegen also weder Punktmutationen noch Deletionen im Gen vor. Damit kann eine Verschiebung des Stoppsignals mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Demnach ist das PYC2-Gen, mit dem die Zelllinie CHO DG44/D3 transfiziert wurde, als intakt anzunehmen.

Bei der in Abb. 3.1.1 dargestellten Hybridisierung wurde eine Sonde aus dem Plasmid pCMVSHE-PYC2 verwendet. Die Sonde wurde wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben aus

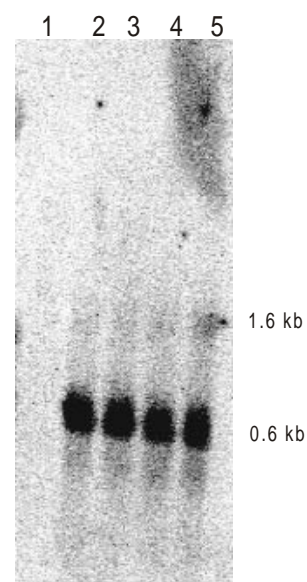
doppelsträngiger DNA durch *Random Priming* hergestellt.

Um auszuschließen, dass es sich bei dem Signal bei 10,2 kb um eine Hybridisierung mit doppelsträngiger DNA handelt, die bei der RNA-Isolierung nicht eliminiert wurde, erfolgte eine Hybridisierung von RNA-Blots mit jeweils vier einzelsträngigen Oligonucleotiden als Sonde (siehe Kapitel 2.3.7). Die beiden Sonden Hyb-1 und Hyb-2 sind

Hybridisierung mit Sonde Hyb-2



Hybridisierung mit Sonde Non-Hyb-1



Bahn 1: RNA-Standard
Bahn 2: CHO DG44/D3 MWCB (untransfiziert)
Bahn 3: CHO DG44/D3 pAG-MK
Bahn 4: CHO DG44/D3 PYC2-B2
Bahn 5: CHO DG44/D3 PYC2-G2

Abb. 3.1.2: Northern-Blot-Analyse mit einzelsträngigen Oligonucleotiden als Sonden

komplementär zum PYC2-codierenden DNA-Strang, die Sonden Non-Hyb-1 und Non-Hyb-2 sind komplementär zu Hyb-1 bzw. zu Hyb-2 und damit zum nicht-codierenden DNA-Strang im PYC2-Gen. Das Ergebnis zeigt Abb. 3.1.2.

Die zur Hybridisierung eingesetzten RNA-Blots enthalten RNA aus verschiedenen Klonen. In Bahn 1 ist ein RNA-Molekulargewichtsstandard (Life Technologies, Karls-

ruhe Deutschland) aufgetragen. Die Bahnen 2-5 enthalten cytoplasmatische RNA aus CHO DG44/D3; in den Bahnen 2 und 3 ist RNA aus nicht mit PYC2 transfizierten Zellen aufgetragen, in den Bahnen 4 und 5 RNA der PYC2-Klone B2 und G2. Die Hybridisierungen mit den Sonden Hyb-1 und Non-Hyb-2 haben keine Signale hervorgerufen.

In Abb. 3.1.2 sind deutliche Unterschiede der Hybridisierungsmuster mit den Sonden Hyb-2 und Non-Hyb-1 zu erkennen. Bei der Hybridisierung mit der Sonde Hyb-2 weisen die CHO DG44/D3-Klone PYC2-B2 und PYC2-G2 ein sehr ähnliches Muster auf wie nach der Hybridisierung mit der Sonde aus dem Vektor pCMVSHE-PYC2 (vergleiche Abb. 3.1.1). Wiederum ist bei Klon PYC2-B2 ein Transkript vorhanden, das hier mit einer Länge von 9,5 kb deutlich größer ist als 3,8 kb, wie theoretisch zu erwarten wäre. Beide PYC2-Klone weisen nach der Hybridisierung Transkripte auf mit Fragmentlängen von 4,2 kb und 2,8 kb. Die nicht mit PYC2 transfizierten CHO DG44/D3 (Bahnen 3 und 4) zeigen diese Signale nicht.

Die Hybridisierung mit der Sonde Non-Hyb-1 ergab völlig andere Transkripte: In den Bahnen 2-5, in denen die RNA aus CHO DG44/D3 aufgetragen ist, sind Signale bei 0,6 kb und 1,6 kb zu erkennen. Es resultieren keine Unterschiede zwischen mit PYC2 transfizierten Zellen (Bahnen 4 und 5) und den nicht mit PYC2 transfizierten Zellen (Bahnen 2 und 3).

Beide Sonden hybridisieren erwartungsgemäß nicht mit dem RNA-Molekulargewichtstandard.

Da die Hybridisierungen mit den Sonden Hyb-2 und Non-Hyb-1 unterschiedliche Transkripte hervorbringen, kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei den nach den Hybridisierungen zu erkennenden Signalen um doppelsträngige DNA handelt. Die mit PYC2 transfizierten und die nicht mit PYC2 transfizierten CHO DG44/D3-Zellen enthalten unterschiedliche Transkripte; dieses zeigt die Expression der PYC2 auf mRNA-Ebene.

3.1.3 Bestimmung der Aktivität der Pyruvat-Carboxylase 2

Zur Bestimmung der Aktivität der Pyruvat-Carboxylase 2 stand eine Methode nach Atkin et al. (1979) und Irani (2000) zur Verfügung. Mit diesem Verfahren zur Bestimmung der Aktivität der Pyruvat-Carboxylase konnte allerdings nicht zwischen der mitochondrialen und der rekombinanten, cytosolischen Pyruvat-Carboxylase differenziert werden, da als Aktivator Acetyl-CoA zugesetzt wurde (Atkin et al., 1979). Durch Acetyl-CoA können sowohl die mitochondriale Mammalia-Pyruvat-Carboxylase als auch die cytosolischen Hefe-Pyruvat-Carboxylasen PYC1 und PYC2 aktiviert werden (siehe Tab. 1.5). Um allein die Aktivität der rekombinanten, cytosolischen Pyruvat-Carboxylase messen zu können erfolgte eine Modifikation des Verfahrens nach Atkin et al. (1979). Durch den Zusatz von Palmitoyl-CoA anstelle von Acetyl-CoA sollte eine ausschließliche Aktivierung der rekombinanten PYC2 erreicht werden, da die mitochondriale Pyruvat-Carboxylase nicht durch dieses Coenzym A-Derivat aktiviert werden kann (siehe Tab. 1.5). Die Enzymreaktion ist in Abb. 2.2.1 dargestellt.

3.1.3.1 Nachweis der PYC-Aktivität im Rohextrakt von *Saccharomyces cerevisiae*

Zuerst wurde der nach Atkin (1979) modifizierte Enzymtest mit Rohextrakt der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. Diese Hefe enthält die beiden Isoenzyme PYC1 und PYC2, die beide durch Palmitoyl-CoA aktiviert werden können (Utter, 1975). Der Rohextrakt wies eine spezifische Enzymaktivität von 22 pkat pro mg Gesamtprotein auf. Dieses Ergebnis zeigt, dass durch diese Messmethode die Aktivität der PYC nachweisbar ist.

3.1.3.2 Bestimmung der PYC2-Aktivität in Rohextrakten der CHO DG44/D3-Klone PYC2-B2 und pAG-MK

Zur Aktivitätsbestimmung der rekombinanten PYC2 in den CHO DG44/D3-Klonen PYC2-B2 und pAG-MK wurde der nach Atkin (1979) modifizierte Enzymtest mit Palmitoyl-CoA als Aktivator herangezogen, da mit dieser Methode PYC-Aktivität im Rohextrakt von *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen werden konnte (siehe

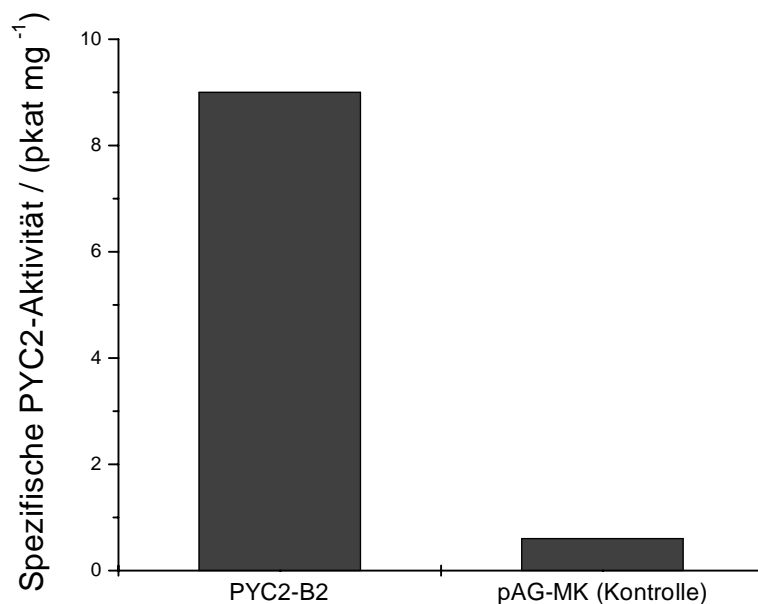


Abb. 3.1.3: Spezifische Aktivität des CHO DG44/D3-Klons PYC2-B2 und der Kontrolle CHO DG44/D3 pAG-MK

3.1.3.1). In Abb. 3.1.3 sind die spezifischen PYC2 Aktivitäten bezogen auf die Gesamtproteinmenge dargestellt.

Der Klon CHO DG44/D3 PYC2-B2 wies eine spezifische Enzymaktivität von 9 pkat mg⁻¹ auf. Dagegen konnte in der Kontrolle CHO DG44/D3 pAG-MK lediglich eine Enzymaktivität von 0,6 pkat mg⁻¹ gemessen werden.

Dieses Ergebnis beweist die Aktivität der Hefe-Pyruvat-Carboxylase 2 im Rohextrakt des Klons CHO DG44/D3 PYC2-B2 und korreliert mit den Resultaten der Northern-Blot-Analytik, da bei diesem Klon ebenfalls die Transkription der PYC2 gezeigt werden konnte (siehe 3.1.2).

3.1.4 Wachstum und Energiemetabolismus von PYC2-Klonen der Zelllinie CHO DG44/D3

Zur Untersuchung des Effekts der rekombinanten Pyruvat-Carboxylase 2 auf den

Metabolismus der Zelllinie CHO DG44/D3 wurden der PYC2-Klon B2 dieser Zelllinie und als Kontrolle die geneticinresistente Klonmischung (pAG-MK) diskontinuierlich kultiviert (Satzkultur).

In dem Klon CHO DG44/D3 PYC2-B2 konnte die Expression der PYC2 durch Northern-Blot-Analytik und auch durch Aktivitätsbestimmung gezeigt werden (siehe 3.1.2 und 3.1.3). Die Klonmischung CHO DG44/D3 pAG-MK wurde als Kontrolle gewählt, da sie einen Durchschnitt aller Klone der Zelllinie CHO DG44/D3 darstellt, die ausschließlich das Resistenzgen gegen G418 tragen. Die Klonvariabilität wird bei der Klonmischung jedoch nicht berücksichtigt.

Das Wachstum der Zellen, die Verbrauchsrate der Substrate Glucose und Glutamin sowie die Lactatbildungsraten wurden in zwei Kultivierungsexperimenten miteinander verglichen. Im Folgenden werden die Ergebnisse von CHO DG44/D3 PYC2-B2 und pAG-MK aus diesen beiden Experimenten vergleichend dargestellt.

3.1.4.1 Zellwachstum

In Abb. 3.1.4 ist die Lebendzellkonzentration über der Kultivierungszeit aufgetragen. Sie lag in beiden Satzkulturen bei dem Klon CHO DG44/D3 PYC2-B2 deutlich höher als bei der Kontrolle pAG-MK. Auch die Wachstumsraten waren bei PYC2-B2 größer als bei der Kontrolle.

In beiden Kultivierungsexperimenten erreichte CHO DG44/D3 PYC2-B2 nach 8 Tagen eine maximale Lebendzellkonzentration von $2,4 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ und lag damit höher als die Kontrolle pAG-MK, deren maximale Zellkonzentration im ersten Experiment bei $1,7 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ lag und im zweiten Experiment bei $1,6 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Auch die Wachstumsrate des Klons PYC2-B2 lag in beiden Experimenten mit $\mu = 0,6 \text{ d}^{-1}$ höher als bei pAG-MK ($\mu = 0,4 \text{ d}^{-1}$).

In Abb. 3.1.4 ist weiterhin zu erkennen, dass nach einem schnellen Anstieg der Zellkonzentration des Klons PYC2-B2 zu Beginn der Kultivierung eine ebenso schnelle Verringerung nach 8 Tagen auftrat.

CHO DG44/D3 PYC2-B2 und pAG-MK tragen als Selektionsmarker die Resistenz gegen das Antibiotikum Geneticin und wurden somit ausschließlich mit Geneticin

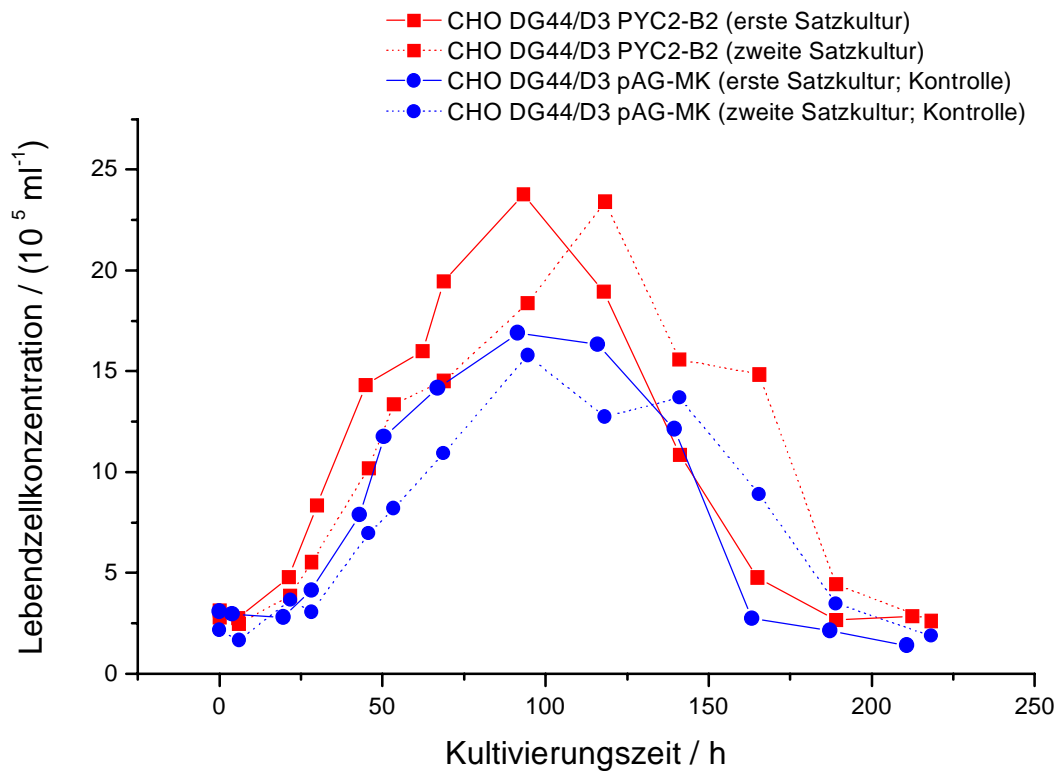


Abb. 3.1.4: Zeitlicher Verlauf der Lebendzellkonzentrationen des PYC2-Klons B2 der Zelllinie CHO DG44/D3 im Vergleich zur genetizinresistenten Kontrollklonmischung dieser Zelllinie

selektioniert (ohne Zugabe von Methotrexat). Die Ursache für die Verringerung der Viabilität des schnell wachsenden Klons PYC2-B2 nach 10 Tagen wurde zunächst in einer Limitierung der im Medium enthaltenen Nucleoside vermutet, da die Zelllinie CHO DG44/D3 das für den Nucleotidstoffwechsel und somit für die DNA-Synthese unentbehrliche Enzym Dihydrofolat-Reductase nicht exprimiert und darum auf die Supplementierung von Nucleosiden zum Kulturmedium angewiesen ist. Bei der Analyse der Nucleoside in Kulturüberständen der Zelllinien CHO DG44/D3 PYC2-B2 und CHO DG44/D3 pAG-MK konnten allerdings keine Unterschiede bei den beiden Zelllinien festgestellt werden.

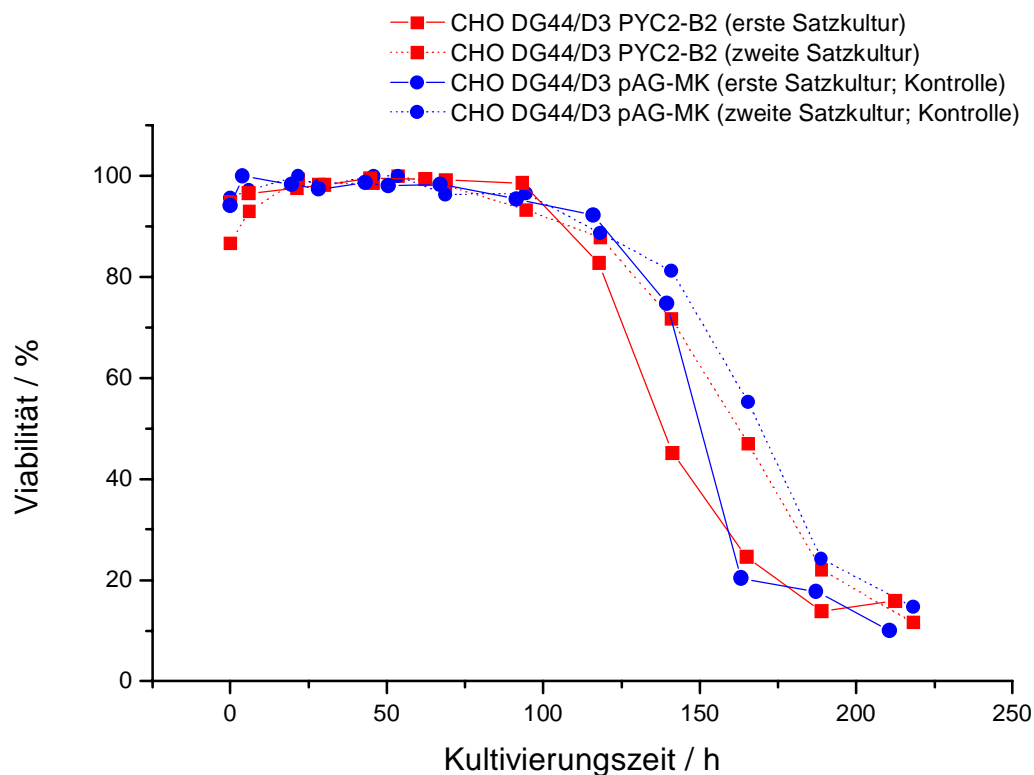


Abb. 3.1.5: Zeitlicher Verlauf der Zellviabilität

Abb. 3.1.5 zeigt die Viabilität der Zellen über der Kultivierungszeit.

Nach 9 Tagen sank sowohl die Viabilität der Zelllinie CHO DG44/D3 PYC2-B2 als auch die Viabilität der Kontrolle pAG-MK. Es sind keine Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Viabilität zu erkennen.

3.1.4.2 Zellspezifische Glucoseverbrauchsrate und Lactatbildungsrate

Der zeitliche Verlauf der Glucoseverbrauchs- und Lactatbildungsrate ist in Abb. 3.1.6 dargestellt. Die aufgezeigten metabolischen Raten sind auf die entsprechende Lebendzellkonzentration bezogen.

Bei der Bestimmung und zum Vergleich der zellspezifischen Substratverbrauchsrate und Lactatbildungsrate ist die frühe exponentielle Phase des Zellwachstums, also bis

ungefähr 48 Stunden Kultivierungszeit, am signifikantesten. Zu dieser Zeit ist die Zusammensetzung des Kulturmediums weitgehend einheitlich, so dass nur hier ein exakter Vergleich möglich ist. In der frühen exponentiellen Wachstumsphase erreichen die Verbrauchsrate ein Maximum und nehmen mit zunehmender Kultivierungsdauer ab, da die Substrate im Kulturmedium erschöpft werden (Fitzpatrick et al., 1993;

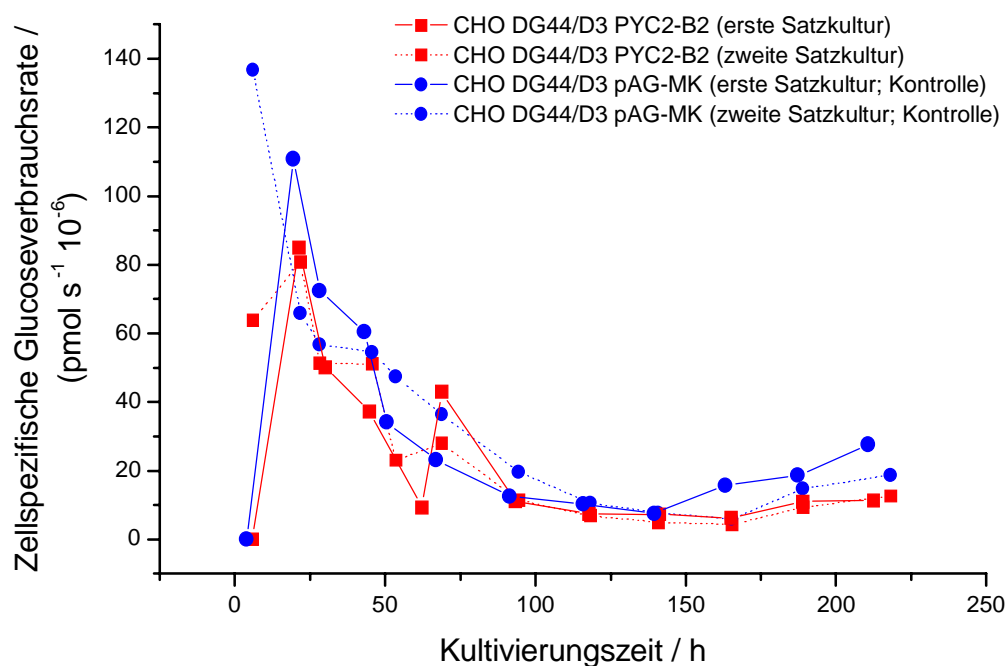


Abb. 3.1.6: Zeitlicher Verlauf der zellspezifischen Glucoseverbrauchsrate der Zelllinie CHO DG44/D3 PYC2-B2 im Vergleich zur Kontrolle

Ljunggren und Häggström, 1994). Die im Laufe der Kultivierung eintretenden Veränderungen der Substratkonzentrationen im Medium beeinflussen die Substrataufnahme der Zellen und damit die Substratverbrauchsrate (Zielke, 1984). Folglich sind dann die Substrataufnahmeraten nicht nur abhängig von den Eigenschaften der Zelle, sondern auch von den Kulturbedingungen. Für einen Vergleich der Substrataufnahmeraten muss daher die frühe exponentielle Phase herangezogen werden.

In Abb. 3.1.6 fällt auf, dass die zellspezifische Glucoseverbrauchsrate des CHO

DG44/D3 PYC2-Klons B2 und der Kontrolle pAG-MK aus dem ersten Experiment nach dem ersten Tag der Kultivierung bei Null lag und nach dem zweiten Tag ein Maximum erreichte; dies ist darauf zurückzuführen, dass diese Zelllinien sich nach dem ersten Tag der Kultivierung noch in der lag-Phase befanden. Sie erreichten die maximale zellspezifische Glucoseverbrauchsrate nach 48 Stunden Kulturdauer in der frühen exponentiellen Phase.

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass der CHO DG44/D3-Klon PYC2-B2 in beiden Satzkulturen leicht geringere zellspezifische Glucoseverbrauchsraten zeigte als die geneticinresistente Kontrollklonmischung pAG-MK. Die maximale zellspezifische Glucoseverbrauchsrate von PYC2-B2 lag mit $85 \text{ pmol s}^{-1} 10^{-6}$ im ersten Kultivierungsexperiment deutlich unterhalb der maximalen zellspezifischen Glucoseverbrauchsrate der Kontrolle pAG-MK, die bei $111 \text{ pmol s}^{-1} 10^{-6}$ lag. Dieses Ergebnis konnte im zweiten Experiment bestätigt werden: Der Klon PYC2-B2 und die Kontrolle pAG-MK wiesen zellspezifische Glucoseverbrauchsrate von $81 \text{ pmol s}^{-1} 10^{-6}$ bzw.

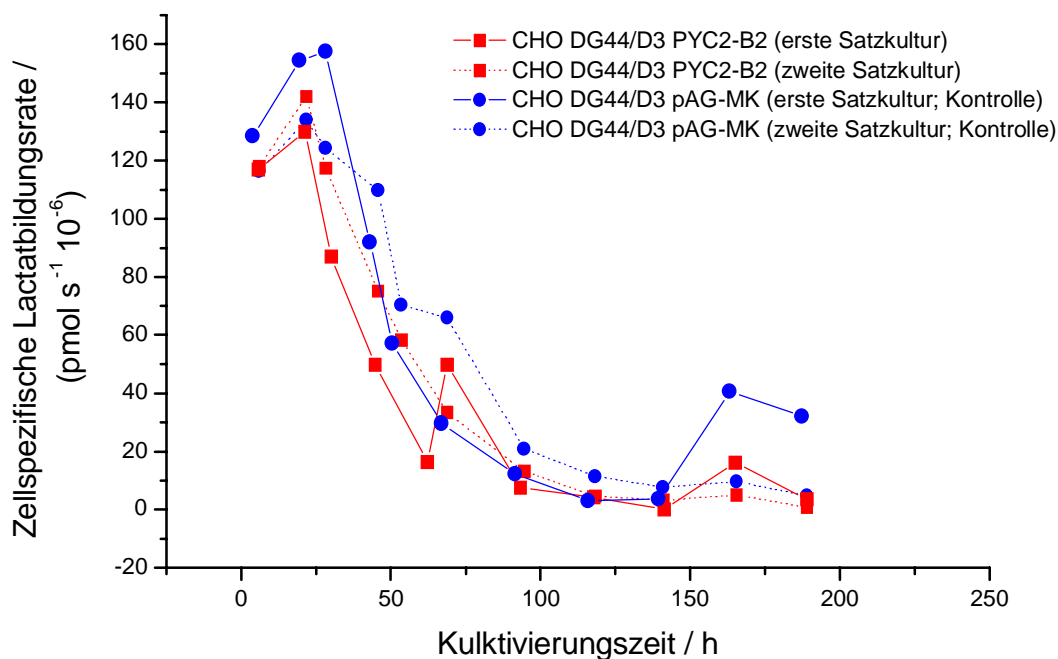


Abb. 3.1.7: Zeitlicher Verlauf der zellspezifischen Lactatproduktionsrate des PYC2-Klons B2 der Zelllinie CHO DG44/D3 im Vergleich zur Kontrolle

136 pmol s⁻¹ 10⁻⁶ auf. Da der Klon PYC2-B2 in beiden Experimenten niedrigere Glucoseverbrauchsrate aufwies als die Kontrolle pAG-MK ist bezüglich des Glucoseverbrauchs eine signifikante Verringerung erreicht worden. Im ersten Experiment wurde der Glucoseverbrauch um den Faktor 1,3 verringert, im zweiten Experiment um den Faktor 1,7.

Abb. 3.1.7 zeigt die zellspezifische Lactatproduktion. Aus den bereits oben angegebenen Gründen ist auch für einen Vergleich der Lactatproduktionsraten die frühe exponentielle Phase des Zellwachstums am signifikantesten. Während dieser Phase hatte der PYC2-Klon B2 ein Maximum von 130 pmol s⁻¹ 10⁻⁶ im ersten Kultivierungsexperiment und wies in der zweiten Satzkultur ein Maximum von 142 pmol s⁻¹ 10⁻⁶ auf. Die zellspezifische Lactatbildungsrate der Kontrollkultur pAG-MK war in der ersten Satzkultur mit 157 pmol s⁻¹ 10⁻⁶ höher als bei PYC2-B2, in der zweiten Satzkultur lag die zellspezifische Lactatbildungsrate der Kontrolle jedoch mit 134 pmol s⁻¹ 10⁻⁶ unterhalb derjenigen des Klons PYC2-B2. Die beiden Kultivierungsexperimente zeigten demnach unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der zellspezifischen Lactatproduktionsraten und somit konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Klon PYC2-B2 und der Kontrolle festgestellt werden. Die in beiden Kultivierungsexperimenten im Vergleich zur Kontrolle geringeren Glucoseverbrauchsrate von PYC2-B2 (vergleiche Abb. 3.1.6) korrelierten nicht mit den Lactatproduktionsraten dieses Klons.

3.1.4.3 Zellspezifische Glutaminverbrauchsrate

In Abb. 3.1.8 sind die Glutaminverbrauchsrate bezogen auf die jeweilige Lebendzellkonzentration über der Kultivierungszeit aufgetragen. Analog zur Bestimmung und zum Vergleich der Glucoseverbrauchsrate ist hierbei ebenfalls die frühe exponentielle Wachstumsphase der Zellen entscheidend.

Im Gegensatz zu den zeitlichen Verläufen der Glucoseverbrauchs- und Lactatproduktionsrate (vergleiche Abb. 3.1.6 und Abb. 3.1.7) zeigten die Glutaminverbrauchsrate, insbesondere am Anfang der Kultur, keinen einheitlichen Verlauf. Sie unterlagen zu Beginn der Kultivierung Schwankungen und nahmen mit der Erschöpfung des

Substrats Glutamin gegen Ende der Kultur ab. Aus den zwei Kultivierungsexperimenten ergaben sich unterschiedliche Werte sowohl für PYC2-B2 als auch für pAG-MK. Die zellspezifische Glutaminverbrauchsrate von PYC2-B2 lag in der ersten Satzkultur bei $35 \text{ pmol s}^{-1} 10^{-6}$ und in der zweiten bei $43 \text{ pmol s}^{-1} 10^{-6}$. Die Unterschiede in den Glutaminverbrauchsrate in den beiden Experimenten waren bei der Kontrolle pAG-

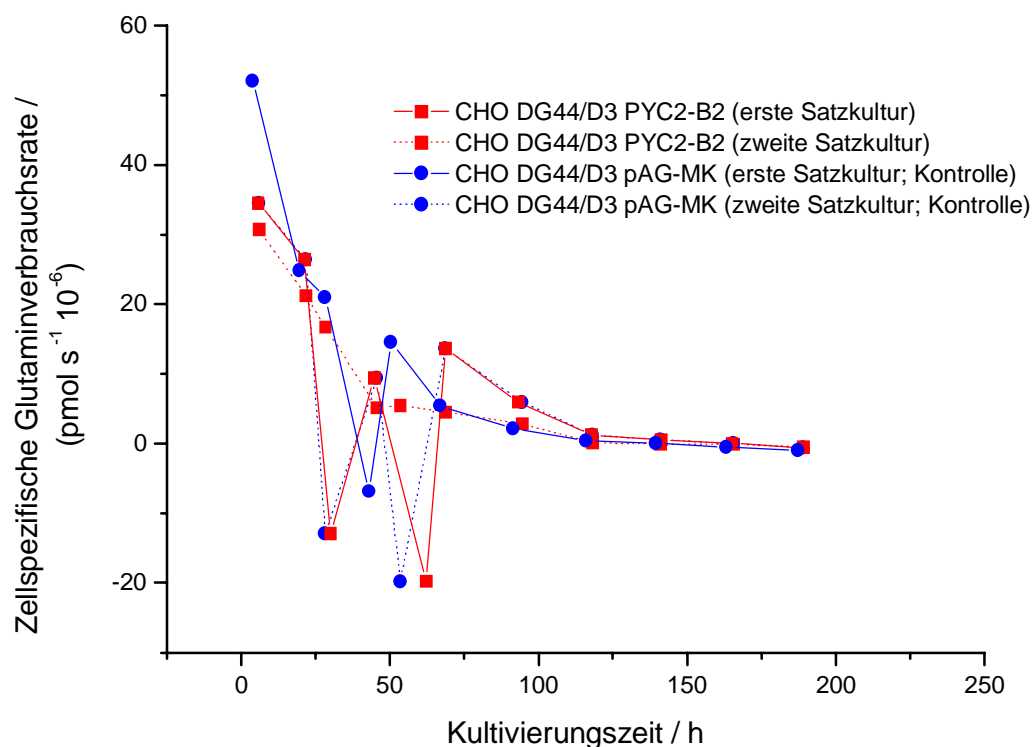


Abb. 3.1.8: Zellspezifische Glutaminverbrauchsrate der Zelllinie CHO DG44/D3 PYC2-B2 und der Kontrolle CHO DG44/D3 pAG-MK

MK noch größer: Im ersten Experiment wurde eine zellspezifische Glutaminverbrauchsrate von $52 \text{ pmol s}^{-1} 10^{-6}$ bestimmt, im zweiten Experiment lag die zellspezifische Glutaminverbrauchsrate bei $34 \text{ pmol s}^{-1} 10^{-6}$. Die aus Abb. 3.1.8 ersichtlichen Schwankungen bei der Bestimmung der zellspezifischen Glutaminverbrauchsrate sind zu erheblich, um Aussagen über den Effekt der PYC2 auf den Glutaminverbrauch der Zelllinie CHO DG44/D3 zu treffen.

3.1.4.4 Glucose- und Lactatkonzentrationen im Kulturüberstand

In Abb. 3.1.9 und Abb. 3.1.10 ist der Verlauf der Glucose- bzw. Lactatkonzentrationen in den Kulturüberständen von PYC2-Klonen der Zelllinie CHO DG44/D3 und der Kontrollkultur pAG-MK wiedergegeben. Bei dieser Darstellung wird die in der Kultur vorliegende Zellkonzentration nicht berücksichtigt.

Der Verlauf der Glucosekonzentrationen ist bei dem PYC2-Klon B2 der Zelllinie CHO DG44/D3 und der Kontrolle CHO DG44/D3 pAG-MK nahezu gleich. Beim Vergleich von PYC2-B2 und pAG-MK aus den zwei nacheinander durchgeführten Kultivierungsexperimenten sind keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Zelllinien ersichtlich.

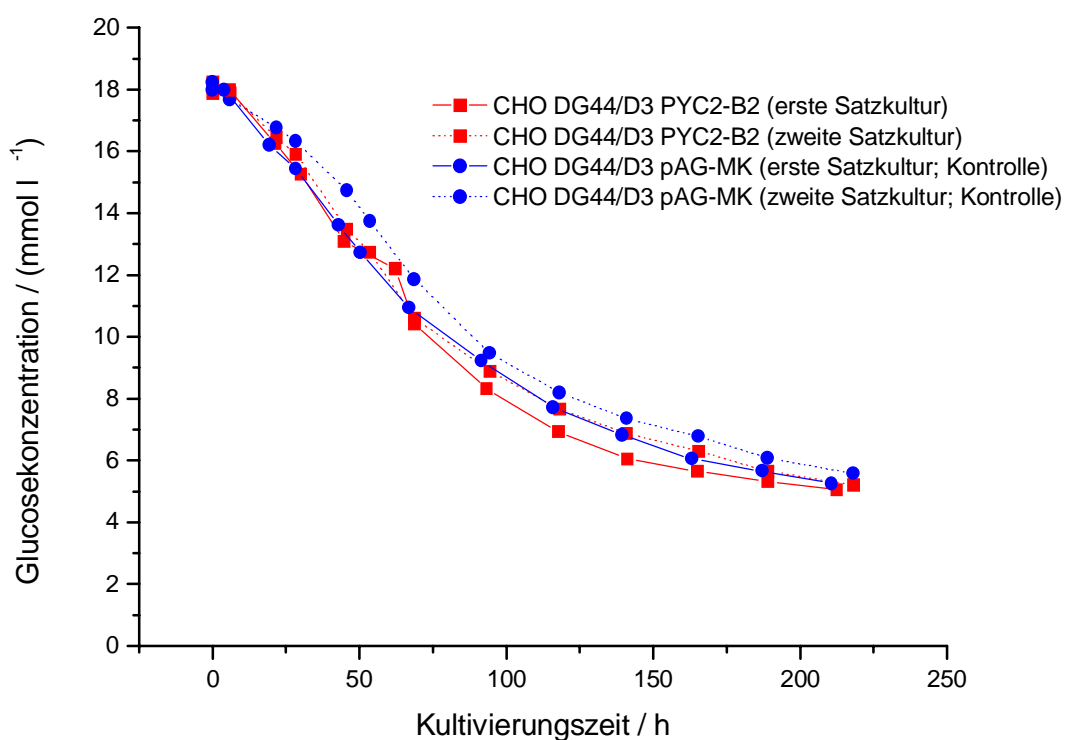


Abb. 3.1.9: Zeitlicher Verlauf der Glucosekonzentration in den Kulturüberständen des PYC2-Klons B2 der Zelllinie CHO DG44/D3 im Vergleich zur Kontrollkultur

Zu Beginn der Kultivierung lag eine Glucosekonzentration von 18 mmol l^{-1} vor. Im

Laufe der Kultivierung nahm die Glucosekonzentration bei dem PYC2-Klon und der Kontrolle gleichermaßen ab und erreichte am Ende der Kultivierung einen Wert von 5 mmol l^{-1} . Die Glucose war somit auch am Ende der Kultur nicht erschöpft.

Auch beim zeitlichen Verlauf der Lactatkonzentrationen sind keine Unterschiede zwischen PYC2-B2 und der Kontrolle pAG-MK zu erkennen. Im ersten Kultivierungsexperiment lag die Lactatkonzentration PYC2-B2 mit $14,7 \text{ mmol l}^{-1}$ noch geringfügig unterhalb derer von pAG-MK ($15,2 \text{ mmol l}^{-1}$). Im zweiten Experiment wurden allerdings

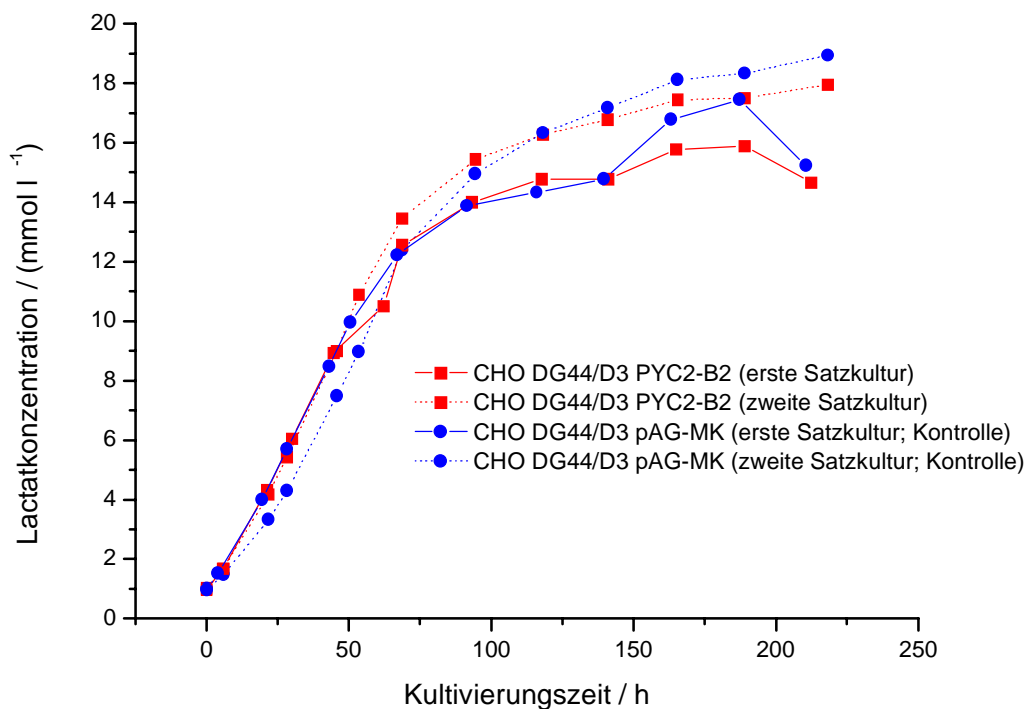


Abb. 3.1.10: Zeitlicher Verlauf der Lactatkonzentration in den Kulturüberständen des PYC2-Klons B2 der Zelllinie CHO DG44/D3 im Vergleich zur Kontrollkultur

für PYC2-B2 und pAG-MK Lactatkonzentrationen von $17,9 \text{ mmol l}^{-1}$ bzw. $18,9 \text{ mmol l}^{-1}$ bestimmt. Die Lactatkonzentration im Kulturüberstand von PYC2-B2 war zwar wieder geringer als diejenige von pAG-MK, aber sie lag höher als die Lactatkonzentration im Kulturüberstand von pAG-MK im ersten Experiment. Somit konnten auch beim Ver-

gleich des zeitlichen Verlaufs der Lactatkonzentrationen im Kulturüberstand keine signifikanten Unterschiede zwischen dem PYC2-Klon B2 der Zelllinie CHO DG44/D3 und der Kontrolle pAG-MK festgestellt werden.

3.1.5 Zusammenfassung

Die Expression der rekombinanten PYC2 aus *Saccharomyces cerevisiae* in der Zelllinie CHO DG44/D3 konnte bei dem Klon PYC2-B2 durch Transkriptionsanalyse und Aktivitätsbestimmung nachgewiesen werden. Die Analyse des Energiemetabolismus dieses Klons ergab in zwei Kultivierungsexperimenten ein im Vergleich zur Kontrolle besseres Wachstumsverhalten (siehe 3.1.4.1). In zwei nacheinander durchgeführten Experimenten erreichte der Klon PYC2-B2 eine 1,5fach höhere maximale Zellkonzentration als die Kontrolle. Auch die Wachstumsrate dieses Klons war 1,5fach höher als diejenige der Kontrolle pAG-MK. Außerdem lagen die zellspezifischen Glucoseverbrauchsrate dieses Klons unterhalb derjenigen der Kontrolle. Im ersten Experiment wurde eine 1,3fach niedrigere zellspezifische Glucoseverbrauchsrate ermittelt, im zweiten Experiment eine 1,7fach geringere. Allerdings konnten keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der zellspezifischen Glutaminverbrauchs- und Lactatproduktionsraten festgestellt werden.

3.2 Konstruktion eines bicistronischen Plasmids mit den Genen für Human Growth Hormone und Pyruvat-Carboxylase

Durch Cotransfektion von CHO DG44/D3 mit Dihydrofolat-Reductase und einem Transfergen besteht die Möglichkeit der Amplifikation des Transfergens durch schrittweise Zugabe von Methotrexat zum Kulturmedium (siehe 1.6). Bei der Cotransfektion eines bicistronischen Plasmids mit der Dihydrofolat-Reductase können beide auf dem bicistronischen Plasmid liegenden Gene durch die Methotrexatzugabe amplifiziert werden (Kaufman und Sharp, 1982). Trägt das bicistronische Plasmid die Gene für ein Modellprotein und die Pyruvat-Carboxylase 2 aus *Saccharomyces cerevisiae*, dann kann durch Amplifikation dieser beiden Gene sowohl die Produktion des Modellproteins erhöht als auch der Energiestoffwechsel verbessert werden.

Als Modellprotein wird Human Growth Hormone (HGH) gewählt, da dieses Protein von der Zelle sekretiert wird und leicht mittels ELISA nachgewiesen werden kann.

3.2.1 Strategie zur Herstellung des bicistronischen Plasmids

Das bicistronische Plasmid soll so konstruiert werden, dass das HGH-codierende Gen in 3'-Richtung hinter dem Promotor liegt; in 3'-Richtung hinter dem HGH-Gen sollen ein IRES-Element und das PYC2-Gen eingebaut werden. Ein zweites bicistronisches Plasmid soll zur Kontrolle konstruiert werden, das ebenfalls unmittelbar nach dem Promotor in 3'-Richtung das HGH-Gen und das IRES trägt; nach dem IRES jedoch sollte das PYC2-Gen in umgekehrter Orientierung eingebaut werden. Dieses bicistronische Plasmid hat die gleiche Größe wie das mit dem PYC2-Gen in richtiger Orientierung, allerdings ist keine Transkription der PYC2 möglich.

3.2.2 Konstruktion des bicistronischen Plasmids mit Hilfe der Plasmide pSBC-1 und pSBC-2

Das bicistronische Plasmid mit den Genen für HGH und PYC2 sowie das zur Kontrolle dienende Plasmid mit dem HGH-Gen und der PYC2 in umgekehrter Orientierung wurden mit Hilfe der beiden Plasmide pSBC-1 und pSBC-2 konstruiert (siehe Abb. 3.2.1). Die beiden Plasmide wurden von Dirks et al. (1993) hergestellt und beschrieben. Sie wurden von Dr. Manfred Wirth (Abteilung Regulation und Differenzierung, GBF, Braunschweig, Deutschland) für die folgenden Arbeiten zur Verfügung gestellt. Beide Plasmide weisen eine SV40-Promotorregion und eine multiple Klonierungsstelle sowie eine Polyadenylierungsstelle (SV40 polyA-Region) auf. Das Plasmid pSBC-1 enthält von 5'-Richtung nach 3'-Richtung zwischen der multiplen Klonierungsstelle und der Polyadenylierungsstelle ein IRES (Polio 5'-UTR), das bei der Translation der mRNA die Bindung eines Ribosoms ermöglicht und somit die Translation des zweiten Cistrons der mRNA initiiert.

Durch Insertion des HGH-codierenden Gens in die multiple Klonierungsstelle von pSBC-1 wurde zunächst das Plasmid pSBC-1-HGH konstruiert. Das PYC2-Gen wurde in die multiple Klonierungsstelle von pSBC-2 in beiden Orientierungen inseriert. Durch

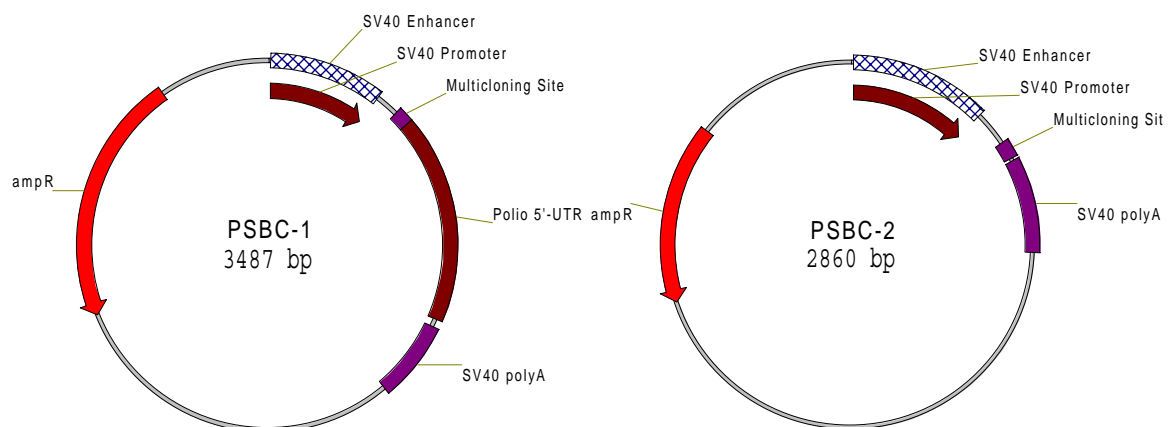


Abb. 3.2.1: pSBC-1 und pSBC-2

die Insertion des PYC2-Gens in richtiger Orientierung resultierte das Plasmid pSBC-2-PYC2. Durch die Einführung des PYC2-Gens in umgekehrter Orientierung entstand

das Plasmid pSBC-2-PYC2wd. Die beiden bicistronischen Plasmide mit den Genen für HGH und PYC2 bzw. HGH und PYC2 in umgekehrter Orientierung werden als pSBC-1/2-HGH/PYC2 bzw. als pSBC-1/2-HGH/PYC2wd bezeichnet.

pSBC-1/2-HGH/PYC2 entstand, indem pSBC-1-HGH und pSBC-2-PYC2 mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *SfiI* geschnitten wurden und durch entsprechende Ligation zum bicistronischen Plasmid verknüpft wurden. pSBC-1/2-HGH/PYC2wd wurde analog konstruiert, indem pSBC-1-HGH und pSBC-2-PYC2wd geschnitten und entsprechend ligiert wurden.

3.2.3 Konstruktion des Plasmids pSBC-1-HGH

Der erste Schritt zur Konstruktion der bicistronischen Plasmide pSBC-1/2-HGH/PYC2 und pSBC-1/2-HGH/PYC2wd war die Herstellung des monocistronischen Plasmids pSBC-1-HGH. Dazu musste das für HGH codierende Gen in die multiple Klonierungsstelle von pSBC-1 inseriert werden. Das Plasmid pTKGH trägt das für HGH codierende Gen. Es wurde von Selden et al. (1986) konstruiert und beschrieben. pTKGH wurde von Dr. Manfred Wirth (Abteilung Regulation und Differenzierung, GBF, Braunschweig, Deutschland) für die folgenden Experimente zur Verfügung gestellt. Die für HGH codierende Sequenz musste mit geeigneten Restriktionsenzymen aus dem Plasmid pTKGH herausgeschnitten und in die multiple Klonierungsstelle von pSBC-1 eingefügt werden. Die DNA-Sequenz des HGH-Gens ist bei Denoto et al. (1981) beschrieben. In 3'-Richtung nach 335 Basen befindet sich das Startcodon ATG, bei 1797 Basen liegt das Stopcodon TAG. Außerdem enthält das HGH-Gen ein Polyadenylierungssignal (AATAAA) nach 1886 Basen. Da das HGH-Gen im bicistronischen Plasmid vor dem IRES liegt und damit das Gen ist, welches von 5'-Richtung in 3'-Richtung zuerst transkribiert wird, musste das Polyadenylierungssignal aus dem HGH-Gen entfernt werden. Anderenfalls würde keine bicistronische mRNA entstehen. Demzufolge mussten in der DNA-Sequenz des HGH-Gens Schnittstellen für Restriktionsendonucleasen gesucht werden, die die HGH-codierende Sequenz in 5'-Richtung vor dem Startcodon und in 3'-Richtung zwischen Stopcodon und Polyade-

nylierungssignal schneiden. Eine solche Restriktionsschnittstelle darf sich nicht in der HGH-codierenden Sequenz befinden, da diese durch eine Restriktion zerstört würde. Im HGH-Gen wurden keine Restriktionsschnittstellen gefunden die diesen Anforderungen entsprechen. Daher wurde die Strategie entwickelt, durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) geeignete Restriktionsschnittstellen in das HGH-Gen einzufügen. Durch Einfügen einer Schnittstelle für das Enzym *EcoRI* (GAATCC) in 5'-Richtung vor dem Startcodon und durch Einfügen einer Schnittstelle für das Enzym *HindIII* (AAGCTT) in 3'-Richtung zwischen Stopcodon und Polyadenylierungssignal war es möglich, die HGH-codierende Sequenz aus pTKGH herauszuschneiden und in richtiger Orientierung in den Vektor pSBC-1 zu inserieren, da in der multiplen Klonierungsstelle von pSBC-1 die *EcoRI*-Schnittstelle in 3'-Richtung vor der *HindIII*-Schnittstelle liegt. Für die PCR wurden folgende Primer entwickelt und von Life Technologies (Karlsruhe, Deutschland) bezogen:

HGS2 FOR: AGG AGA ATT CAC CAT GGC TAC AGG TAA GCG CCC

HGS2 REV: AGG AAA GCT TAG CTA GAA GCC ACA GCT GCC C

Mit *EcoRI* wurde der Vektor pTKGH präparativ gespalten. Es wurde ein DNA-Abschnitt herausgeschnitten, in dem das HGH-Gen liegt. Durch Gelelektrophorese und anschließendes Ausschneiden und Eluieren aus dem Gel mit dem kommerziell erhältlichen Kit JETsorb (Genomed, Bad Oeynhausen, Deutschland) erfolgte eine Aufreinigung des DNA-Fragments mit dem HGH-Gen; dieses wurde in TE-Puffer pH 8 (siehe 2.4.2.1) bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C gelagert.

Zur Einführung der *EcoRI*- und *HindIII*-Schnittstelle wurde eine PCR durchgeführt. Der Forward-Primer HSG2 FOR enthält die *EcoRI*-Schnittstelle und das Startcodon ATG, der Reverse-Primer HSG2 REV die *HindIII*-Schnittstelle und das Stopcodon TAG (siehe oben). Die Reagenzien für die PCR wurden, wenn nicht anders angegeben, aus dem kommerziell erhältlichen Kit *GeneAmp* PCR Core Reagents von Perkin Elmer (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA) verwendet. Die PCR wurde mit

1 ng Template-DNA durchgeführt. Als Template-DNA wurde das mit *EcoRI* aus dem Vektor pTKGH herausgeschnittene DNA-Fragment verwendet, das das HGH-codierende Gen enthält (siehe oben). Die Reaktionsmischung setzte sich folgendermaßen zusammen:

69,7 µl	autoklaviertes, hochreines Wasser
10 µl	10x PCR Puffer II (Zusammensetzung siehe unten)
16 µl	dNTP-Mischung (Zusammensetzung siehe unten)
1,3 µl	Vent-DNA-Polymerase (2 U µl ⁻¹ , New England Biolabs, Schwalbach, Deutschland)
1 µl	HSG2 FOR (100 pmol µl ⁻¹)
1 µl	HSG2 REV (100 pmol µl ⁻¹)
1 µl	Template-DNA (1 ng µl ⁻¹)
<hr/>	
100 µl	Gesamtvolumen

10x PCR-Puffer II:

100 mmol l ⁻¹	Tris-HCl, pH 8,3
500 mmol l ⁻¹	KCl

dNTP-Mischung:

500 µl	autoklaviertes, hochreines Wasser
125 µl	dATP
125 µl	dTTP
125 µl	dGTP
125 µl	dCTP
<hr/>	
1000 µl	Gesamtvolumen

Die PCR wurde mit dem Thermocycler Personal Cycler (Biometra, Göttingen, Deutsch-

land) durchgeführt. Dabei wurde der Deckel des Thermocyclers auf 150 °C erhitzt um eine Kondensation der PCR-Probe an diesem zu verhindern. Für die Polymerase-Kettenreaktion wurde ein Programm mit folgenden Parametern gewählt:

Schritt	Temperatur / °C	Zeit / min	Heizrate / (°C/s)	zurück zu Schritt	Zyklen
1	85	5	2	-	
2	98	2	2	-	
3	98	1	2	-	
4	61	1	0,5	-	
5	75	2	2	3	29
6	75	5	2	-	
7	4	Pause	2	-	

Nach Ablauf der PCR wurde das entstandene DNA-Fragment aus der Probe mit dem kommerziell erhältlichen Kit JETquick (Genomed, Bad Oeynhausen, Deutschland) nach der Vorschrift des Herstellers aufgereinigt und in 50 µl autoklaviertem, hochreinem Wasser aufgenommen. 2 µl dieser DNA-Lösung wurden auf einem Agarosegel aufgetragen. Durch Vergleich mit einem ebenfalls aufgetragenen DNA-Molekulargewichtsstandard (Längenstandard III, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) wurde eine Fragmentlänge von ungefähr 1500 bp ermittelt. Anschließend wurde das entstandene DNA-Fragment präparativ mit *EcoRI* und *HindIII* gespalten. 25 µl der Lösung des aufgereinigten DNA-Fragments wurden mit jeweils 2 Enzymeinheiten (units, U) *EcoRI* und *HindIII* (beide New England Biolabs, Schwalbach, Deutschland) 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Als Enzymeinheit ist diejenige Menge eines Restriktionsenzym definiert, die in der Lage ist, bei für das jeweilige Restriktionsenzym optimalen Puffer- und Temperaturbedingungen 1 µg DNA in einer Stunde vollständig zu spalten (Ibelgauf, 1993). Nach der Restriktion erfolgte eine Auftrennung dieses Ansatzes auf einem Agarosegel. Das ungefähr 1500 bp große DNA-Fragment wurde

mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten, mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Kits JETsorb (Genomed) nach der Vorschrift des Herstellers aus dem Gel eluiert und in 30 µl TE-Puffer pH = 8,0 (siehe 2.4.2.1) aufgenommen. Zur Kontrolle der Aufreinigung wurden 2 µl auf einem Agarosegel aufgetragen und anschließend erfolgte die Lagerung des Ansatzes bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung.

Auch der Vektor pSBC-1 wurde präparativ mit *EcoRI* und *HindIII* gespalten. 10 µg DNA wurden mit jeweils 6 U *EcoRI* und *HindIII* 3 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die Aufreinigung des ungefähr 3450 bp großen Fragments erfolgte mit Hilfe des Kits JETsorb (siehe oben); das aufgereinigte Fragment wurde anschließend in 30 µl TE-Puffer pH = 8,0 aufgenommen. Zur Überprüfung der Aufreinigung wurden 2 µl auf einem Agarosegel aufgetragen. Die Lagerung des Fragments erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C. Vor der Ligation des HGH-Fragments (Insert) mit dem pSBC-1-Fragment (Vektor) wurde die Konzentration der beiden Fragmente durch Vergleich der Intensität der Fluoreszenz mit derjenigen des auf dem Gel mitgelaufenen Molekulargewichtsstandards abgeschätzt. Für eine effiziente bimolekulare Reaktion zwischen dem pSBC-1-Fragment als Vektor-DNA und dem HGH-Fragment als Insert-DNA sollte das Verhältnis der Konzentrationen von Vektor und Insert 1:3 betragen (Dr. Joop van den Heuvel, GBF, Braunschweig, Deutschland, persönliche Mitteilung). Aus dem Vergleich der Fluoreszenzintensitäten des Vektor- und Insert-Fragments ergibt sich folgender Ligationsansatz:

13 µl	autoklaviertes, hochreines Wasser
2 µl	10x Ligase-Puffer (Roche Diagnostics)
1 µl	T4-Ligase (Roche Diagnostics)
1 µl	pSBC-1-Fragment (Vektor)
3 µl	HGH-Fragment (Insert)

20 µl	Gesamtvolumen
-------	---------------

Der Ansatz wurde über Nacht bei 16 °C in einem Wasserbad (D8 Typ 001-3568, Haake, Berlin, Deutschland) inkubiert und anschließend in kompetente *E. coli* Top 10 transformiert. 20 Bakterienkolonien wurden isoliert und kultiviert. Es erfolgte eine Minipräparation von diesen 20 Einzelkolonien. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde einer Restriktionsanalyse mit *Eco*RI und *Hind*III unterzogen. Alle Proben wiesen die beiden erwarteten Fragmente von 3445 bp und 1473 bp auf. Demzufolge enthielten alle 20 Einzelklone das konstruierte Plasmid pSBC-1-HGH (siehe Abb. 3.2.2).

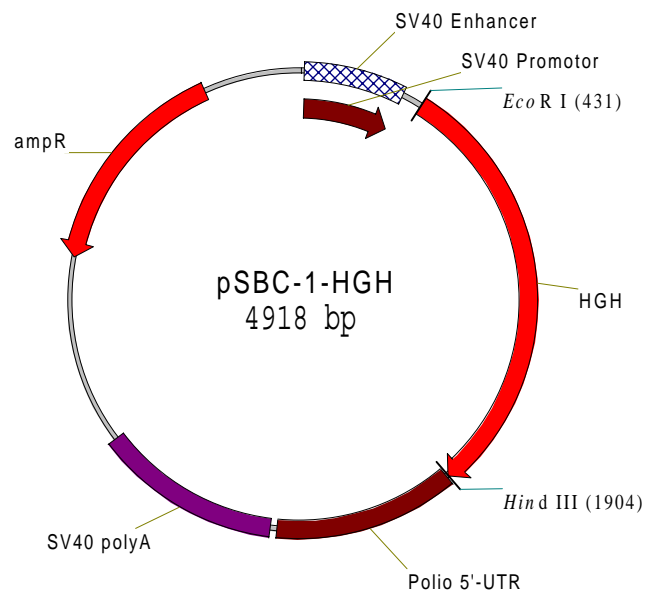


Abb. 3.2.2: pSBC-1-HGH

Die Präparationen der Klone 2 und 5 zeigten bei der Restriktionsanalyse ein sehr intensives Fluoreszenzsignal, so dass von diesen beiden Klonen Plasmid-Maxipräparationen angefertigt wurden. Diese wurden ebenfalls einer Restriktionsanalyse mit *Eco*RI und *Hind*III unterzogen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Das Ergebnis der Restriktionsanalyse ist in Abb. 3.2.3 dargestellt.

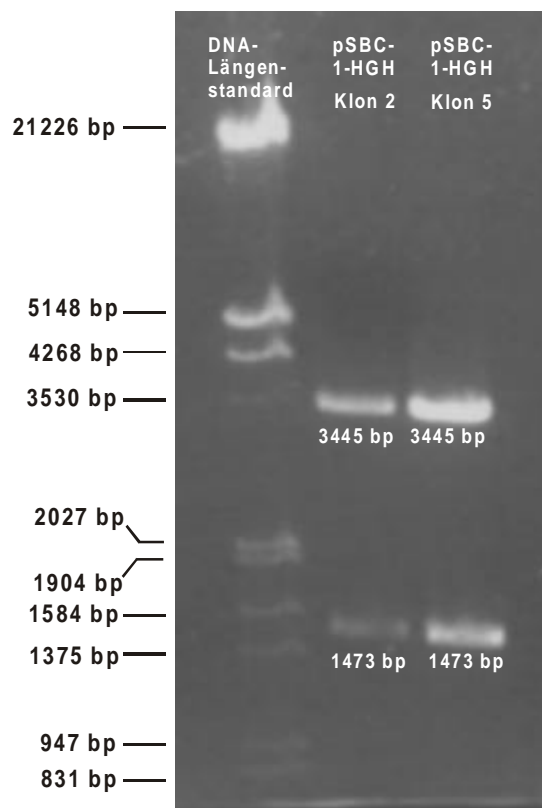


Abb. 3.2.3: Restriktionsanalyse der Klone 2 und 5 des Plasmids pSBC-1-HGH mit *EcoRI* und *HindIII*. Die Abbildung zeigt den DNA-Molekulargewichtsstandard in Bahn 1, daneben in Bahn 2 und 3 die mit *EcoRI* und *HindIII* geschnittenen Maxipräparationen aus Klon 2 bzw. Klon 5. In beiden Bahnen sind die beiden Fragmente von 3445 bp und 1473 bp zu erkennen, die nach der Restriktion mit *EcoRI* und *HindIII* erwartet wurden (siehe Abb. 3.2.2). Demnach enthalten die Klone 2 und 5 das intakte Plasmid pSBC-1-HGH.

3.2.4 Konstruktion des Plasmids pSBC-2-PYC2

Der zweite Schritt zur Konstruktion der bicistronischen Plasmide pSBC-1/2-HGH/PYC2 und pSBC-1/2-HGH/PYC2wd war die Herstellung der monocistronischen Plasmide pSBC-2-PYC2 bzw. pSBC-2-PYC2wd. Zur Konstruktion dieser beiden monocistronischen Plasmide wurde aus dem Vektor pCMVSHE-PYC2 das für PYC2 codierende Gen mit *HindIII* herausgeschnitten und in den mit *HindIII* gespaltenen

Vektor pSBC-2 eingefügt. Durch die Ligation entstand ein Vektor, der die PYC2 in richtiger Orientierung trägt, und auch ein zweiter Vektor, der die PYC2 in umgekehrter Orientierung enthält. Diese beiden Vektoren werden als pSBC-2-PYC2 bzw. als pSBC-2-PYC2wd bezeichnet (siehe Abb. 3.2.4).

10 µg pCMVSHE-PYC2 und 10 µg pSBC-2 wurden mit jeweils 6 U *Hind*III 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Um eine Religation des Vektors pSBC-2 zu verhindern wurde zum Spaltungsansatz von pSBC-2 1 U CIP (Calf Intestinal Phosphatase, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) gegeben. CIP katalysiert die Abspaltung von 5'-Phosphatgruppen von DNA, RNA, Ribo- und Desoxyribonucleosiden.

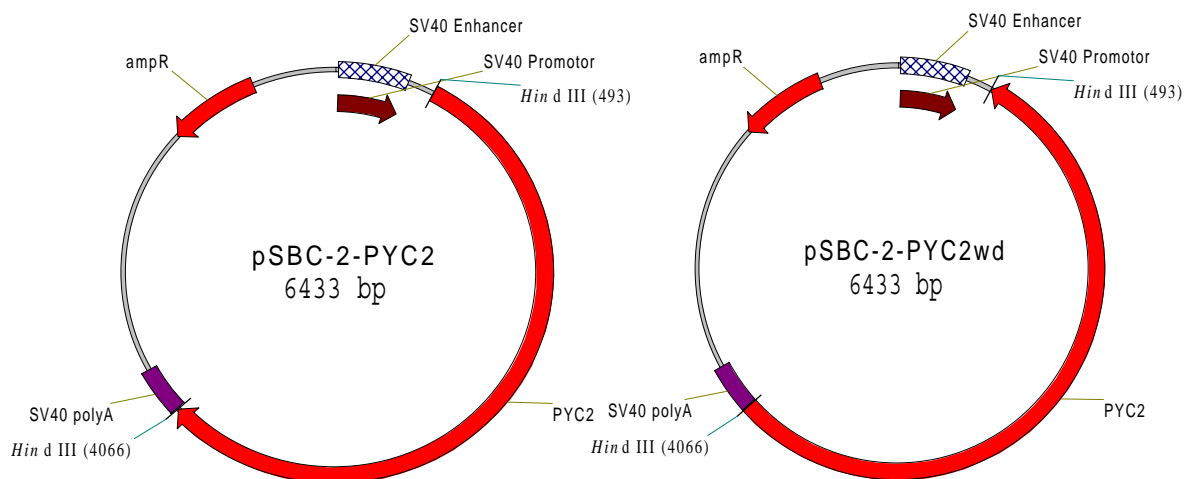


Abb. 3.2.4: pSBC-2-PYC2 und pSBC-2-PYC2wd

Es erfolgte eine halbstündige Inkubation dieses Ansatzes bei 37 °C, anschließend wurde die CIP durch Inkubation von 10 Minuten bei 65 °C (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inaktiviert. Danach wurden die Spaltungsansätze von pCMVSHE-PYC2 und pSBC-2 auf einem Agarosegel aufgetrennt. Unter UV-Licht wurden mit einem Skalpell das PYC2-enhaltende Fragment und der linearisierte Vektor pSBC-2 aus dem Gel ausgeschnitten. Mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Kits JETsorb wurde die DNA nach der Vorschrift des Herstellers aus dem Gel eluiert,

in 30 µl TE-Puffer mit pH = 8 (siehe 2.4.2.1) aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

Zur Ligation wurden folgende Ansätze hergestellt:

Ligationsansatz 1: Ligation von pSBC-2 und PYC2

13 µl	autoklaviertes, hochreines Wasser
1 µl	linearisiertes Plasmid pSBC-2 (siehe oben)
3 µl	PYC2-Fragment (siehe oben)
2 µl	10x T4-Ligase-Puffer (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)
1 µl	T4-Ligase (Roche Diagnostics)
<hr/>	
20 µl	Gesamtvolumen

Ligationsansatz 2: Kontrolle

16 µl	autoklaviertes, hochreines Wasser
1 µl	linearisiertes Plasmid pSBC-2 (siehe oben)
2 µl	10x T4-Ligase-Puffer (Roche Diagnostics)
1 µl	T4-Ligase (Roche Diagnostics)
<hr/>	
20 µl	Gesamtvolumen

Die Ligation wurde über Nacht bei 16 °C in einem Wasserbad (D8 Typ 001-3568, Haake, Berlin, Deutschland) durchgeführt. Anschließend wurde jeweils 1 µl des Ligationsansatzes 1 und des Ligationsansatzes 2 in kompetente *E. coli* Top 10 transformiert, die auf ampicillinhaltigem LB-Selektionsagar kultiviert wurden. Mit Ligationsansatz 1 transformierte *E. coli* bildeten Einzelkolonien auf dem Selektionsagar. *E. coli*,

die mit Ligationsansatz 2 transformiert worden waren, konnten erwartungsgemäß nicht auf dem Selektionsagar wachsen, da durch die Inkubation mit CIP keine Zirkularisierung von pSBC-2 erfolgen konnte. Von den mit Ligationsansatz 1 transformierten *E. coli* wurden 20 Einzelkolonien isoliert und kultiviert. Mit diesen 20 Kulturen wurden Plasmid-Minipräparationen durchgeführt. Diese wurden anschließend einer Restriktionsanalyse mit *Cla*I unterzogen. pSBC-2-PYC2 enthält *Cla*I-Schnittstellen bei 1 bp und 3886 bp, pSBC-2-PYC2wd weist 2 *Cla*I-Schnittstellen bei 1 bp und 673 bp auf. Demzufolge würden aus der Restriktionsanalyse 2 Fragmente resultieren, die entweder Längen von 3886 bp und 2547 bp haben (pSBC-2-PYC2) oder Längen von 5760 bp und 673 bp (pSBC-2-PYC2wd).

Von den 20 isolierten *E. coli*-Klonen enthielten 6 Klone das Plasmid pSBC-2-PYC2 und 5 Klone das Plasmid pSBC-2-PYC2wd. Die Klone 7 und 17 (enthalten pSBC-2-PYC2) und die Klone 1 und 15 (enthalten pSBC-2-PYC2wd) wurden erneut kultiviert. Von diesen Kulturen wurden Plasmid-Maxipräparationen durchgeführt. Diese Maxipräparationen wurden ebenfalls einer Restriktionsanalyse mit *Cla*I unterzogen. Das Ergebnis dieser Restriktionsanalyse ist in Abb. 3.2.5 dargestellt. Wiederum resultierten die erwarteten Fragmentlängen (siehe oben), so dass die hergestellten Plasmid-Maxipräparationen bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert wurden. Außerdem erfolgte eine Langzeitpräservierung der *E. coli*-Klone 1 und 15 sowie 7 und 17 als Glycerinkulturen (siehe 2.1.3.2.2).

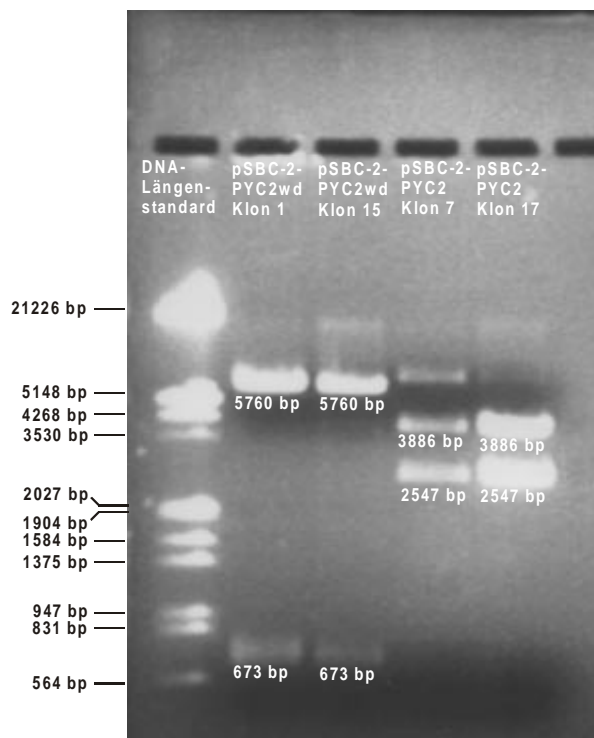


Abb. 3.2.5: Restriktionsanalyse von pSBC-2-PYC2 und pSBC2-PYC2wd mit *Cla*I. In Bahn 1 ist der DNA-Molekulargewichtsstandard aufgetragen, daneben in Bahn 2 und Bahn 3 die mit *Cla*I geschnittenen Maxipräparationen aus den Klonen 1 und 15, die das Plasmid pSBC-2-PYC2wd tragen. Bahn 4 und Bahn 5 zeigt mit *Cla*I geschnittene Maxipräparationen aus den Klonen 7 und 17, die das Plasmid pSBC-2-PYC2 enthalten. Der Restriktionsverdau von pSBC-2-PYC2wd resultierte in den beiden theoretisch erwarteten Fragmenten von 5760 bp und 673 bp (Bahnen 2 und 3), die Restriktionsanalyse von pSBC-2-PYC2 ergab ebenfalls die beiden theoretisch erwarteten Fragmente von 3886 bp und 2547 bp. Die aus den Klonen 1 und 15 sowie 7 und 17 erhaltenen Plasmide sind daher intakt.

3.2.5 Konstruktion des Plasmids pSBC-1/2-HGH/PYC2

Der letzte Schritt zur Konstruktion der bicistronischen Plasmide pSBC-1/2-HGH/PYC2 und pSBC-1/2-HGH/PYC2wd bestand in der Verknüpfung der monocistronischen Plasmide pSBC-1-HGH und pSBC-2-PYC2 bzw. pSBC-2-PYC2wd. Dazu wurden auf den monocistronischen Plasmiden Schnittstellen für 2 Restriktionsenzyme gesucht, die jeweils einmal im Vektor vorkommen, aber nicht in der codierenden Sequenz von

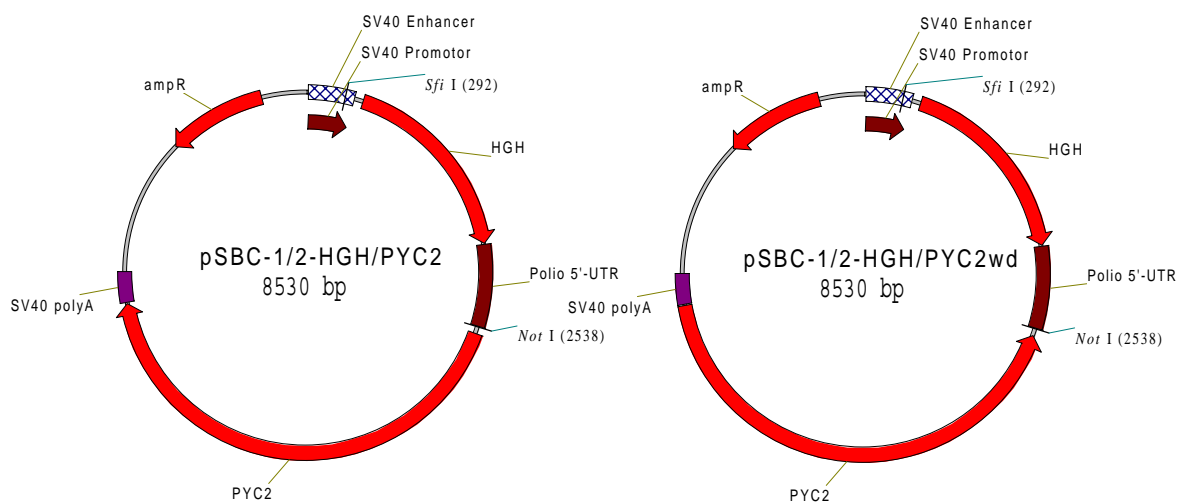


Abb. 3.2.6: pSBC-1/2-HGH/PYC2 und pSBC-1/2-HGH/PYC2wd

HGH oder PYC2 liegen. Diesen Anforderungen entsprachen die Restriktionsschnittstellen für *NotI* und *SfiI*.

pSBC-1-HGH weist eine *NotI*-Schnittstelle bei 2538 bp und eine *SfiI*-Schnittstelle bei 292 bp auf. pSBC-2-PYC2 und pSBC-2-PYC2wd enthalten die *NotI*-Schnittstelle bei 441 bp und die *SfiI*-Schnittstelle bei 292 bp. Durch Restriktion von pSBC-1-HGH und pSBC-2-PYC2 mit *NotI* und *SfiI* und anschließender Ligation wurde das bicistronische Plasmid pSBC-1/2-HGH/PYC2 konstruiert (siehe Abb. 3.2.6), das die Gene für Human Growth Hormone und Pyruvat-Carboxylase 2 trägt. Durch Restriktion von pSBC-1-HGH und pSBC-2-PYC2wd mit *NotI* und *SfiI* und anschließender Ligation wurde das bicistronische Plasmid pSBC-1/2-HGH/PYC2wd konstruiert (siehe Abb. 2.5.4), das das Gen für Human Growth Hormone und das in umgekehrter Orientierung vorliegende Gen für PYC2 enthält.

Zur Konstruktion der beiden bicistronischen Plasmide wurden die Maxipräparationen folgender monocistronischer Plasmide verwendet:

- 10 µg der Maxipräparation von *E. coli* Top 10 pSBC-1-HGH Klon 5
- 10 µg der Maxipräparation von *E. coli* Top 10 pSBC-2-PYC2 Klon 17
- 10 µg der Maxipräparation von *E. coli* Top 10 pSBC-2-PYC2wd Klon 1

Die 10 µg Plasmid-DNA wurden zunächst mit jeweils 5 U *NotI* (New England Biolabs, Schwalbach, Deutschland) 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Dem Ansatz wurden 6 U *SfiI* (New England Biolabs) und eine zehnfach konzentrierte BSA-Lösung (New England Biolabs) hinzugefügt, so dass diese im Gesamtvolumen einfach konzentriert vorlag. Es folgte eine Inkubation des Ansatzes über Nacht bei 50 °C. Anschließend wurden die Spaltungsansätze auf einem Agarosegel aufgetrennt. Mit einem Skalpell wurden unter UV-Licht folgende Fragmente aus dem Agarosegel ausgeschnitten:

- das Fragment der Länge von 2246 bp aus dem Spaltungsansatz von pSBC-1-HGH
- das Fragment der Länge von 6284 bp aus dem Spaltungsansatz von pSBC-2-PYC2
- das Fragment der Länge von 6284 bp aus dem Spaltungsansatz von pSBC-2-PYC2wd

Diese drei Fragmente wurden mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Kits JETsorb (Genomed, Bad Oeynhausen, Deutschland) aus dem Gel eluiert und jeweils in 30 µl TE-Puffer mit pH = 8,0 (siehe 2.4.2.1) aufgenommen. Zur Verknüpfung der Fragmente zu den bicistronischen Plasmiden pSBC-1/2-HGH/PYC2 und pSBC-1/2-HGH/PYC2wd wurden die folgenden Ligationen angesetzt:

Ligationsansatz 1: Konstruktion von pSBC-1/2-HGH/PYC2

13 µl	autoklaviertes, hochreines Wasser
3 µl	2246 bp-Fragment aus der Spaltung von pSBC-1-HGH mit <i>NotI</i> und <i>SfiI</i>
1 µl	6284 bp-Fragment aus der Spaltung von pSBC-2-PYC2 mit <i>NotI</i> und <i>SfiI</i>
2 µl	10x Ligase-Puffer (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)
1 µl	T4-Ligase (Roche Diagnostics)
<hr/>	
20 µl	Gesamtvolumen

Ligationsansatz 2: Konstruktion von pSBC-1/2-HGH/PYC2wd

13 µl	autoklaviertes, hochreines Wasser
2 µl	2246 bp-Fragment aus der Spaltung von pSBC-1-HGH mit <i>NotI</i> und <i>SfiI</i>
1 µl	6284 bp-Fragment aus der Spaltung von pSBC-2-PYC2wd mit <i>NotI</i> und <i>SfiI</i>
2 µl	10x Ligase-Puffer (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)
1 µl	T4-Ligase (Roche Diagnostics)
<hr/>	
20 µl	Gesamtvolumen

Die Ligationen wurden über Nacht bei 16 °C in einem Wasserbad durchgeführt. Anschließend folgte eine Transformation von kompetenten *E. coli* Top 10 mit je 1 µl Ligationsansatz und eine Kultivierung dieser transformierten Bakterien über Nacht bei 37 °C im Brutraum. Von den auf ampicillinhaltigem LB-Selektionsagar gewachsenen Bakterien wurden jeweils 2 Einzelklone isoliert und kultiviert. Von diesen Kulturen wurden Plasmid-Maxipräparationen durchgeführt. Diese wurden zur Kontrolle einer Restriktionsanalyse unterzogen. Zum einen wurde die aufgereinigte Plasmid-DNA mit *NotI* und *SfiI* geschnitten, zum anderen mit *ClaI* (New England Biolabs). Die Restriktionsanalyse ergab die erwarteten Fragmente (siehe Abb. 3.2.7).

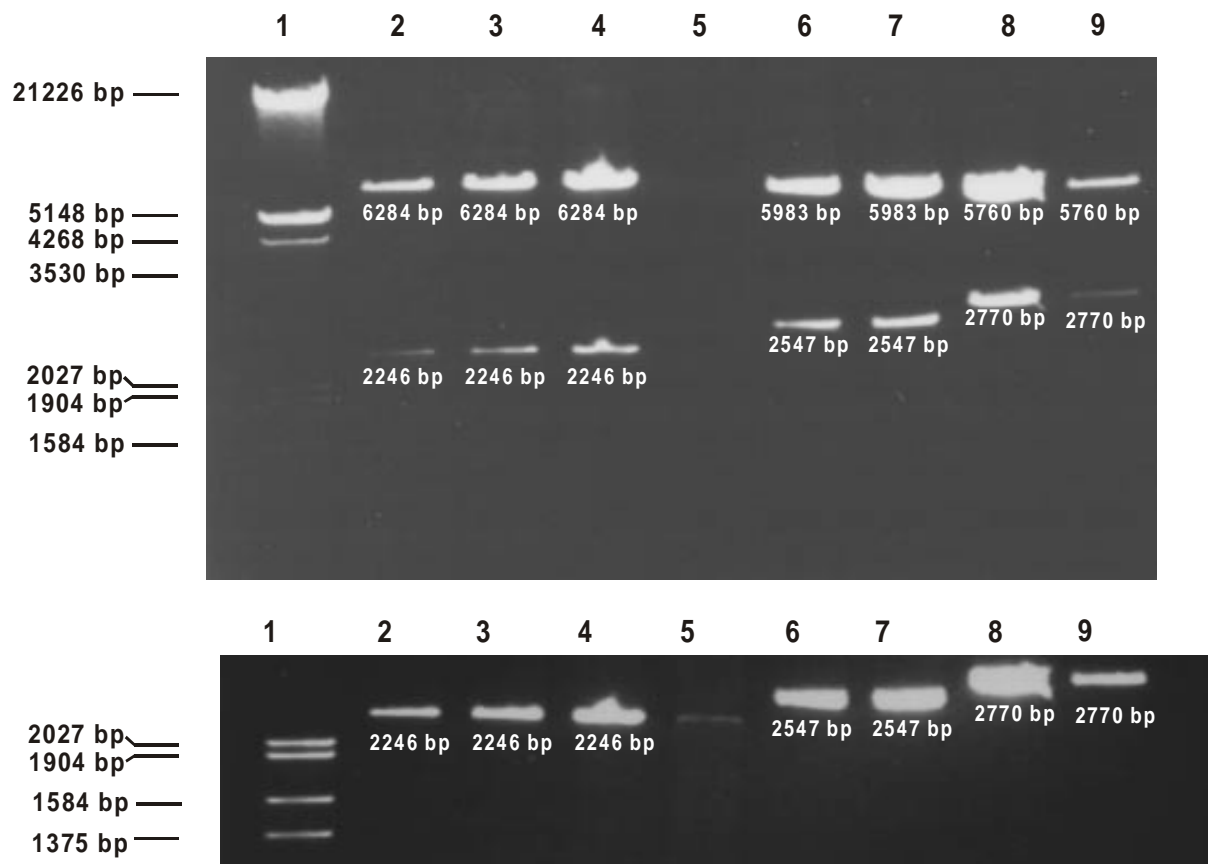


Abb. 3.2.7: Restriktionsanalyse der Plasmid-Maxipräparationen von pSBC-1/2-HGH/PYC2 und pSBC-1/2-HGH/PYC2wd

oben: komplettes Gel

unten: stärker belichteter Ausschnitt des Gels im DNA-Molekulargewichtsbereich von 1375 bp bis 2027 bp

Die Abbildung zeigt, dass die Plasmidpräparationen aus pSBC-1/2-HGH/PYC2 Klon 1 und 2 sowie pSBC-1/2-HGH/PYC2wd Klon 1 und 2 intakt sind. In den Bahnen 2 bis 5 sind die sich nach dem Restriktionsverdau mit *NotI* und *SfiI* ergebenden Fragmente von 6284 bp und 2246 bp zu erkennen. Der Restriktionsverdau mit *ClaI* ermöglicht die Unterscheidung der beiden Plasmide hinsichtlich der Orientierung des PYC2-Gens (Bahnen 6 bis 9): In Bahn 6 und 7 sind zwei Fragmente von 5983 bp und 2547 bp zu erkennen, die nach Restriktion von pSBC-1/2-HGH/PYC2 entstanden sind; Bahn 8 und 9 zeigen zwei Fragmente von 5760 bp und 2770 bp, die aus der Restriktion von pSBC-1/2-HGH/PYC2wd mit *ClaI* resultierten. Diese Analyse beweist, dass das

PYC2-Gen, wie theoretisch erwartet, in den Plasmidpräparationen von pSBC-1/2-HGH/PYC2 in richtiger Orientierung vorliegt und in den Präparationen von pSBC-1/2-HGH/PYC2wd in umgekehrter Orientierung.

Bahn 1:	DNA-Längenstandard III (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)
Bahn 2:	pSBC-1/2-HGH/PYC2 Klon 1, geschnitten mit <i>NotI</i> und <i>SfiI</i>
Bahn 3:	pSBC-1/2-HGH/PYC2 Klon 2, geschnitten mit <i>NotI</i> und <i>SfiI</i>
Bahn 4:	pSBC-1/2-HGH/PYC2wd Klon 1, geschnitten mit <i>NotI</i> und <i>SfiI</i>
Bahn 5:	pSBC-1/2-HGH/PYC2wd Klon 2, geschnitten mit <i>NotI</i> und <i>SfiI</i>
Bahn 6:	pSBC-1/2-HGH/PYC2 Klon 1, geschnitten mit <i>ClaI</i>
Bahn 7:	pSBC-1/2-HGH/PYC2 Klon 2, geschnitten mit <i>ClaI</i>
Bahn 8:	pSBC-1/2-HGH/PYC2wd Klon 1, geschnitten mit <i>ClaI</i>
Bahn 9:	pSBC-1/2-HGH/PYC2wd Klon 2, geschnitten mit <i>ClaI</i>

In Abb. 3.2.7 ist die Restriktionsanalyse der hergestellten bicistronischen Plasmide pSBC-1/2-HGH/PYC2 und pSBC-1/2-HGH/PYC2wd dargestellt. Restriktionen mit den Enzymen *NotI* und *SfiI* ergaben bei beiden Plasmiden Fragmentlängen von 6284 bp und 2246 bp. Die in Bahn 5 aufgetragene DNA-Menge war zu gering; daher ist in der Abbildung kein Fluoreszenzsignal zu erkennen.

Zur Unterscheidung der beiden konstruierten bicistronischen Plasmide wurden diese zusätzlich einer Restriktion mit der Endonuclease *ClaI* unterzogen (Bahnen 6 bis 9). Restriktionen des Plasmids pSBC-1/2-HGH/PYC2 brachten Fragmente mit Längen von 5983 bp und 2547 bp hervor (Bahnen 6 und 7). Die Restriktionen von pSBC-1/2-HGH/PYC2wd resultierten in Fragmenten mit Längen von 5760 bp und 2770 bp.

Die Maxipräparationen von pSBC-1/2-HGH/PYC2 und pSBC-1/2-HGHPYC2wd wurden bis zur weiteren Verwendung (Transfektion von CHO DG44/D3) bei -20 °C gelagert.

Die Transfektion der Zelllinie CHO DG44/D3 erfolgte später mit den Plasmidpräparationen von pSBC-1/2-HGH/PYC2 Klon 2 und pSBC-1/2-HGH/PYC2wd Klon 1 (siehe 3.3).

Mit diesen Experimenten ist das bicistronische Plasmid pSBC-1/2-HGH/PYC2 konstruiert worden, auf dem die Gene für das Modellprotein Human Growth Hormone und die cytosolische Pyruvat-Carboxylase 2 aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* enthalten sind. Durch Cotransfektion der Zelllinie CHO DG44 mit diesem Plasmid und

der Dihydrofolat-Reductase können durch Zugabe von Methotrexat zum Kulturmedium beide Gene gemeinsam amplifiziert werden. Diese Experimente werden im folgenden Kapitel dargestellt.

3.3 Transfektion der Zelllinie CHO DG44/D3 mit dem bicistronischen Plasmid mit den Genen für das Modellprotein Human Growth Hormone und Pyruvat-Carboxylase 2

3.3.1 Transfektion und Selektion

In Kapitel 3.2 wurde die Konstruktion der beiden bicistronischen Plasmide pSBC-1/2-HGH/PYC2 und pSBC-1/2-HGH/PYC2wd beschrieben. pSBC-1/2-HGH/PYC2 trägt die Gene für das Modellprotein Human Growth Hormone (HGH) und Pyruvat-Carboxylase 2 (PYC2). Das Plasmid pSBC-1/2-HGH/PYC2wd enthält ebenfalls das HGH-codierende Gen, außerdem das in umgekehrter Richtung eingebaute PYC2-Gen. Dieses Plasmid dient der Kontrolle bei der Untersuchung des Einflusses der PYC2 auf die Produktion des Modellproteins HGH. Beide Plasmide haben eine Größe von 8530 bp; somit kann ein Einfluss der Plasmidgröße auf die Transfektionseffizienz ausgeschlossen werden.

Die Zelllinie CHO DG44/D3 wurde mit pSBC-1/2-HGH/PYC2 und pAdD26SV(A)-3 bzw. mit pSBC-1/2-HGH/PYC2wd und pAdD26SV(A)-3 cotransfiziert. pAdD26SV(A)-3 enthält das Gen für das Enzym Dihydrofolat-Reductase (siehe 2.1.1.2.4). Nach der Transfektion fand die Selektionierung erfolgreich transfizierter Zellen in Selektionsmedium MEM Alpha Select- High Glucose (siehe 2.1.2.1.5) statt; dieses Nährmedium enthält keine Nucleoside. Die Amplifikation der transfizierten Gene in den Klonmischungen erfolgte durch Zugabe von Methotrexat (MTX) zum Selektionsmedium.

Ein Wachstum der Zellen war bis zu einer Konzentration von $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ MTX im Kulturmedium möglich. Die resultierenden Zelllinien wurden als CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK und CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK bezeichnet. Letztere exprimiert keine PYC2 und diente bei den folgenden Untersuchungen als Kontrolle.

3.3.2 Aktivität der PYC2

Die Zelllinien CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK und CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK wiesen spezifische PYC2-Aktivitäten unterhalb von $2,6 \text{ pkat mg}^{-1}$ auf (siehe Abb. 3.3.1). Die gemessenen Aktivitäten der mit dem PYC2-Gen transfizierten Zelllinie lagen geringfügig unterhalb derjenigen der Kontrollzelllinie, die nicht mit dem PYC2-Gen transfiziert worden ist.

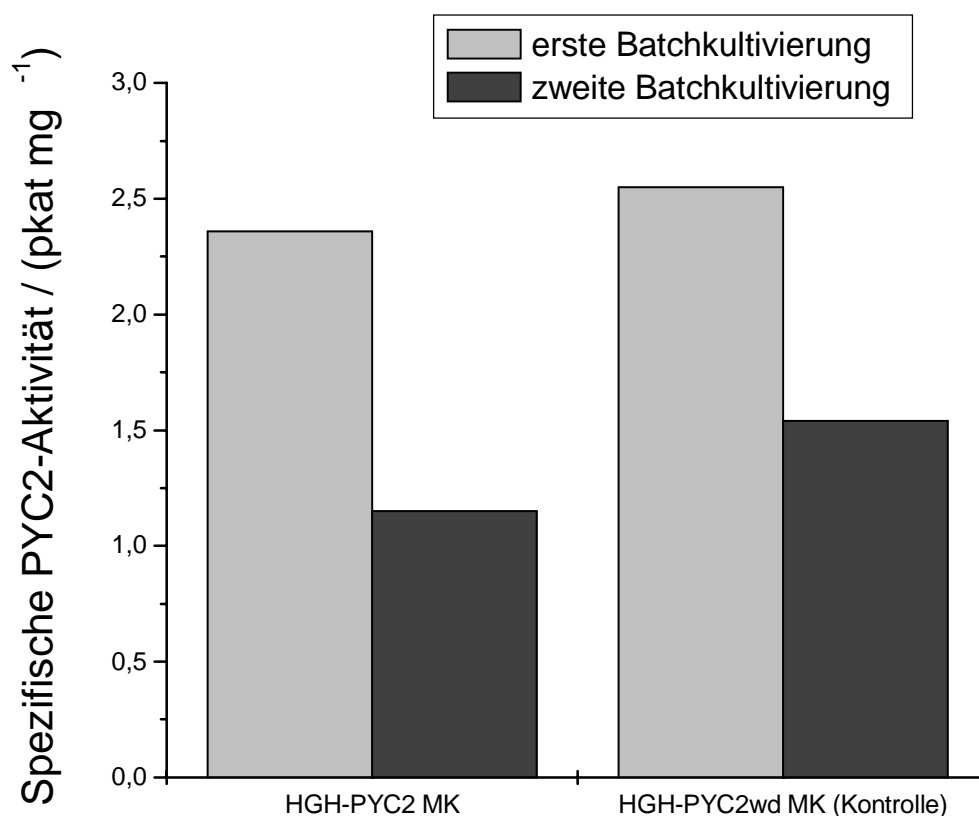


Abb. 3.3.1: PYC2-Aktivität bezogen auf die Gesamtproteinkonzentration

3.3.3 Wachstum und Energiemetabolismus

Das Wachstum und der Energiemetabolismus der Zelllinien CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK und CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK wurden in zwei aufeinander folgenden Batchkultivierungen untersucht und miteinander verglichen. Die Kultivierung beider Zelllinien erfolgte in Suspension in 500 ml Röhreinheiten (Spinnerflaschen, Techne, Cambridge, UK). Die Röhreinheiten waren vor der Inokulation mit 300 ml Kulturmedium MEM Alpha Select- High Glucose gefüllt, das Methotrexat in einer Konzentration von $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ enthielt.

3.3.3.1 Zellwachstum

In Abb. 3.3.2 ist das Wachstum der Zelllinien CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK und CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK vergleichend dargestellt.

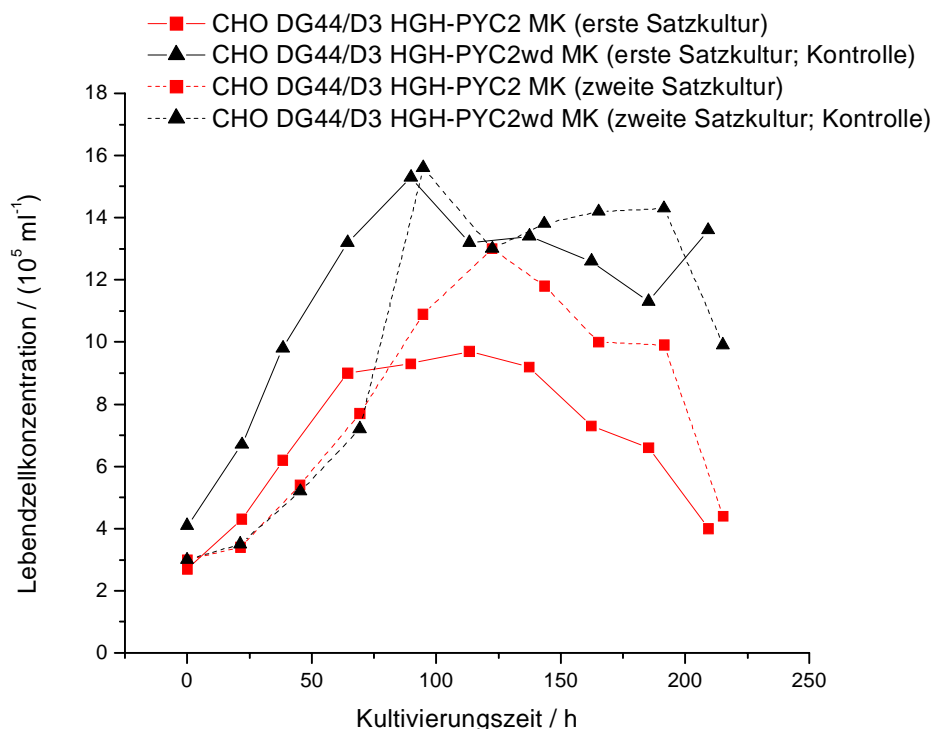


Abb. 3.3.2: Zeitlicher Verlauf der Lebendzellkonzentration

Das Wachstum der Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK zeigte in den beiden

Kultivierungsexperimenten Unterschiede bezüglich der maximal erreichten Zellkonzentration: Im ersten Experiment lag diese bei $9,7 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$, im zweiten Experiment bei $1,3 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Die Wachstumsrate betrug in beiden Batchkultivierungen $\mu = 0,5 \text{ d}^{-1}$. Die Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK erreichte in beiden Kultivierungsexperimenten eine maximale Zellkonzentration von $1,5 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$. Die Wachstumsrate betrug in beiden Experimenten ebenfalls $\mu = 0,5 \text{ d}^{-1}$.

In beiden Experimenten wies die Kontrollzelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK ein besseres Wachstum auf als die CHO DG44/D3-Zelllinie, die mit dem PYC2-Gen transfiziert worden war. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen erreichte die mit dem monocistronischen Plasmid pCMVSHE-PYC2 transfizierte Zelllinie CHO DG44/D3 PYC2-B2 höhere Zellkonzentrationen als die jeweiligen Kontrollzelllinien (vergleiche Abb. 3.1.4).

In Abb. 3.3.3 ist der zeitliche Verlauf der Zellviabilitäten dargestellt. Es sind keine

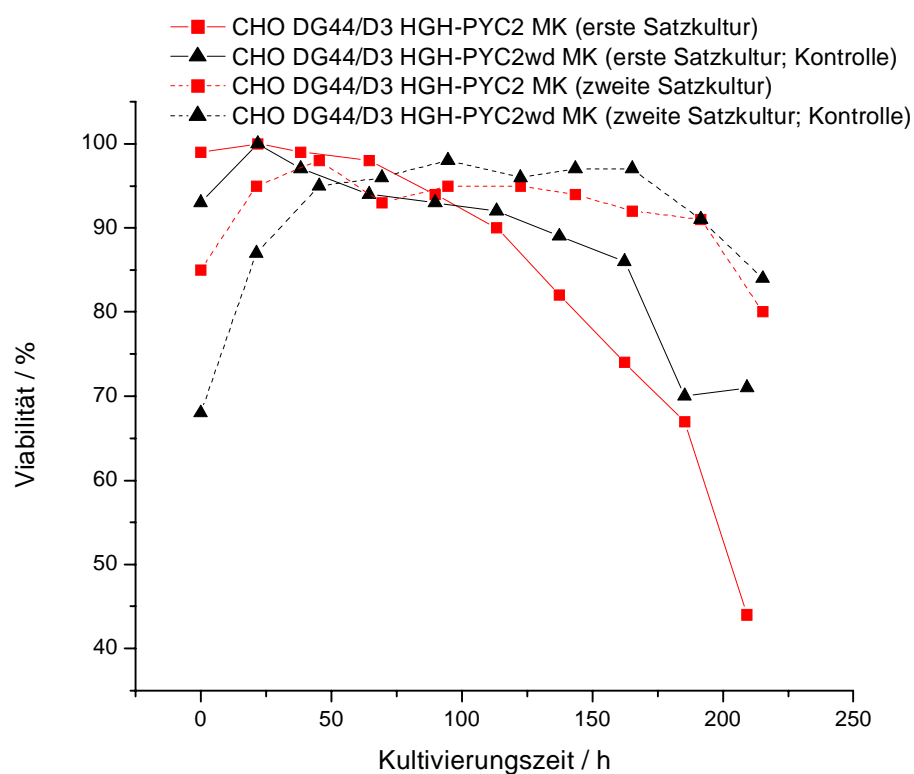


Abb. 3.3.3: Zeitlicher Verlauf der Viabilität

Unterschiede bei den beiden Zelllinien in Bezug auf den zeitlichen Verlauf der Viabilität zu erkennen. Auffällig in Abb. 3.3.3 ist die relativ niedrige Ausgangsviabilität der Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK. Zu Beginn der Kultivierung lag die Viabilität bei 68 %, aber sie stieg im Verlauf des Experiments auf 98 % an. Die Viabilität beider Zelllinien sank erst am letzten Tag der Kultivierung auf einen Wert unterhalb von 90 %.

In Abb. 3.3.3 ist zu erkennen, dass bereits am vierten Tag der Kultivierung die Viabilität beider Zelllinien abnahm.

3.3.3.2 Zellspezifische Substratverbrauchs- und Lactatbildungsraten

In diesem Kapitel werden die zellspezifischen Glucoseverbrauchs- und Lactatbildungsraten der Zelllinien CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK und CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK in den zwei aufeinander folgenden Kultivierungsexperimenten mitei-

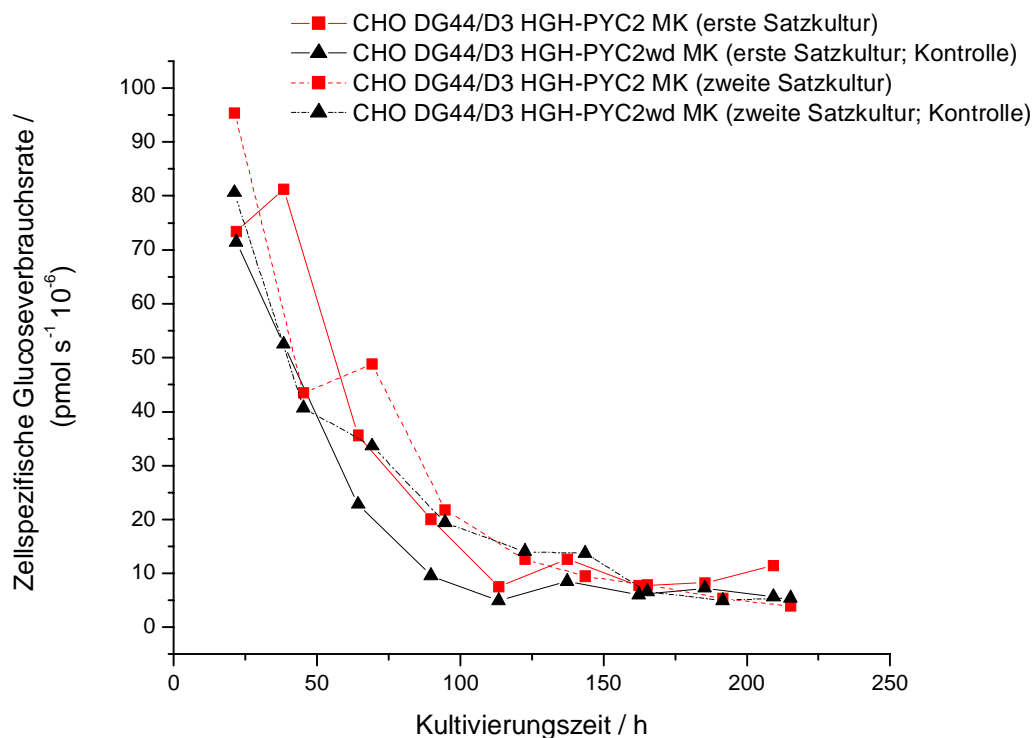


Abb. 3.3.4: Zeitlicher Verlauf der zellspezifischen Glucoseverbrauchsrate

einander verglichen. Die metabolischen Raten wurden auf die entsprechende Lebendzellkonzentration bezogen. Wie in Kapitel 3.1.4.2 beschrieben, wird zum Vergleich der Substratverbrauchs- und Lactatbildungsrate die frühe exponentielle Wachstumsphase herangezogen, also bis 48 h Kultivierungszeit, da hier die Zusammensetzung des Kulturmediums weitgehend einheitlich ist.

In Abb. 3.3.4 ist der zeitliche Verlauf der zellspezifischen Glucoseverbrauchsrate dargestellt. Es sind lediglich geringfügige Unterschiede bezüglich des Glucoseverbrauchs zwischen den beiden Zelllinien zu erkennen. Die Glucoseverbrauchsrate der Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK lagen während der ersten 48 Stunden Kultivierungszeit im ersten Experiment bei $71 \text{ pmol s}^{-1} 10^{-6}$, in der zweiten Satzkultivierung bei $80 \text{ pmol s}^{-1} 10^{-6}$. Die Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK wies Glucoseverbrauchsrate von $81 \text{ pmol s}^{-1} 10^{-6}$ im ersten und $95 \text{ pmol s}^{-1} 10^{-6}$ im zweiten Kultivierungsexperiment auf; sie lagen damit um den Faktor 1,1 bzw. 1,2 höher als die Glucoseverbrauchsrate der Kontrollzelllinie.

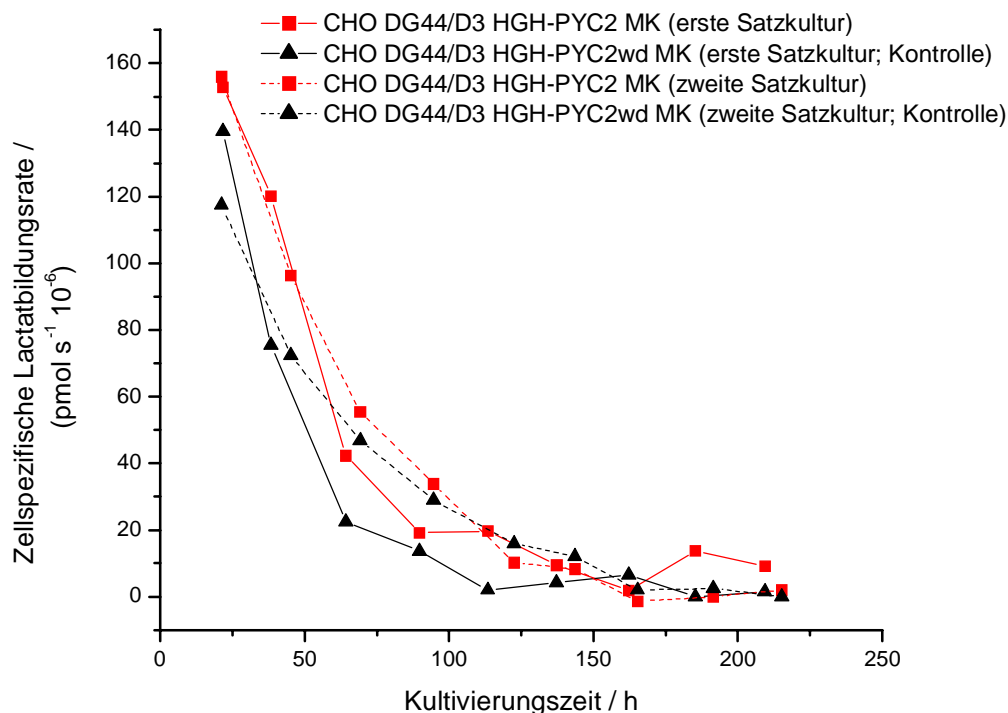


Abb. 3.3.5: Zeitlicher Verlauf der zellspezifischen Lactatproduktionsrate

In Abb. 3.3.5 ist der zeitliche Verlauf der Lactatproduktionsraten bezogen auf die jeweilige Lebendzellkonzentration aufgezeigt. Die Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK wies höhere Lactatproduktionsraten auf als die Kontrollzelllinie. Sie lagen in den Experimenten bei $153 \text{ pmol s}^{-1} 10^{-6}$ bzw. $156 \text{ pmol s}^{-1} 10^{-6}$. Die Lactatproduktionsraten der nicht mit PYC2 transfizierten Kontrollzelllinie lagen bei $140 \text{ pmol s}^{-1} 10^{-6}$ bzw. $117 \text{ pmol s}^{-1} 10^{-6}$. Die Lactatproduktionsraten der Kontrolle waren damit um den Faktor 1,1 bzw. 1,3 geringer als diejenigen der Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK.

Die Abbildung 3.3.6 stellt den Glutaminverbrauch der beiden Zelllinien CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK und CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK dar. Die Glutaminverbrauchsrate sind erneut auf die jeweilige Lebendzellkonzentration bezogen.

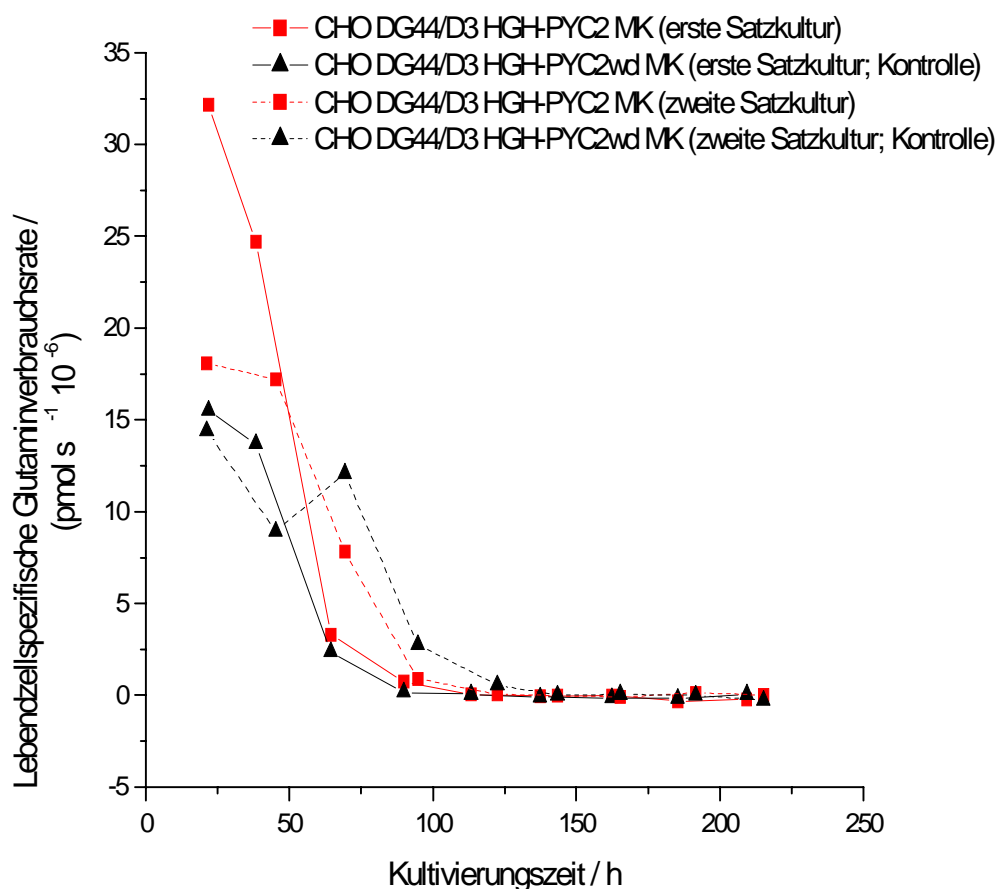


Abb. 3.3.6: Zeitlicher Verlauf der zellspezifischen Glutaminverbrauchsrate

Die zellspezifischen Glutaminverbrauchsraten der Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK lagen mit $32 \text{ pmol s}^{-1} 10^{-6}$ und $18 \text{ pmol s}^{-1} 10^{-6}$ um den Faktor 2 bzw. 1,3 höher als diejenigen der Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK ($16 \text{ pmol s}^{-1} 10^{-6}$ und $14 \text{ pmol s}^{-1} 10^{-6}$).

Die Transfektion mit dem PYC2-Gen innerhalb des bicistronischen Plasmids pSBC-1/2-HGH/PYC2 bewirkte keine offensichtliche Optimierung von Zellwachstum und Energiestoffwechsel der Zelllinie CHO DG44/D3. Andere Resultate wurden mit der Transfektion des PYC2-Gens im monocistronischen Vektor pCMVSHE-PYC2 erzielt (siehe 3.1). Die Ergebnisse werden später ausführlich diskutiert (siehe Kapitel 4).

3.3.4 Produktion von Human Growth Hormone

3.3.4.1 HGH-Konzentration im Kulturüberstand

Die Abbildung 3.3.7 stellt den zeitlichen Verlauf der Konzentration des Modellproteins Human Growth Hormone im ersten Batch-Experiment dar. Die Ergebnisse der zweiten Batchkultivierung sind in der Abbildung 3.3.8 wiedergegeben.

In den Abbildungen ist ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Zelllinien CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK und CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK zu erkennen. Im Kulturüberstand der Kontrollzelllinie, die nicht das PYC2-Gen enthält, war die Konzentration von Human Growth Hormone in der ersten Batchkultivierung um den Faktor 36, in der zweiten Batchkultivierung sogar um den Faktor 6000 höher als bei der Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK. Dabei unterscheidet sich die HGH-Konzentration in den Kulturüberständen der Kontrollzelllinie nur geringfügig in den beiden Kultivierungsexperimenten, sie erreichte ein Maximum von 543 ng ml^{-1} bzw. 582 ng ml^{-1} . Die Produktivität der Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK nahm hingegen in der zweiten Batchkultivierung deutlich ab. Diese Zelllinie wies im Überstand der ersten Kultivierung eine maximale HGH-Konzentration von 15 ng ml^{-1} auf, im zweiten Experiment lag die maximale HGH-Konzentration lediglich bei $0,1 \text{ ng ml}^{-1}$.

Die im Vergleich zur ersten Batchkultivierung deutlich geringeren HGH-Konzentrationen im Kulturüberstand der Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK zeigen, dass die HGH-Produktion dieser Zelllinie nicht stabil war. In Kapitel 4 werden verschiedene Ursachen der extrem geringen Produktivität der Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK diskutiert.

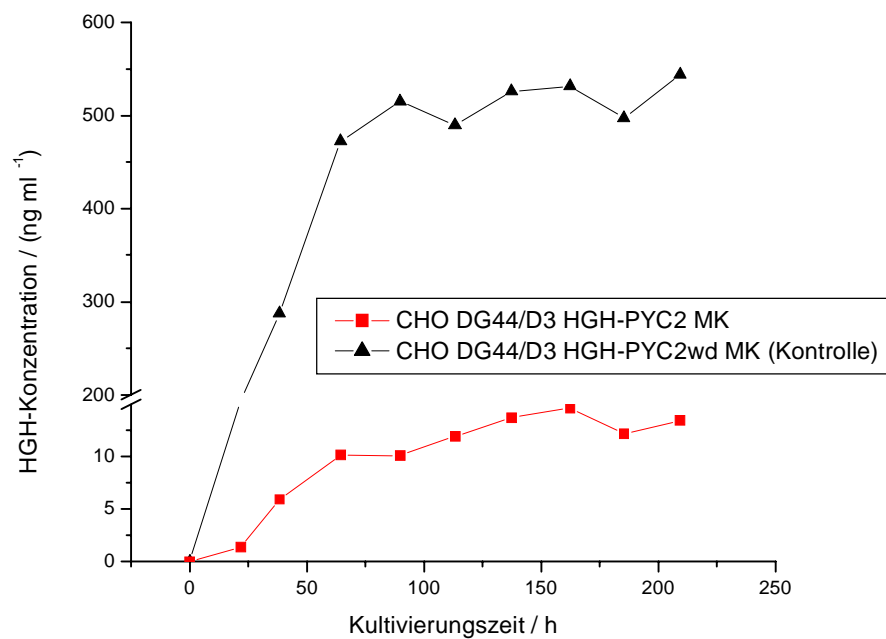


Abb. 3.3.7: Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Human Growth Hormone bei der ersten Batchkultivierung

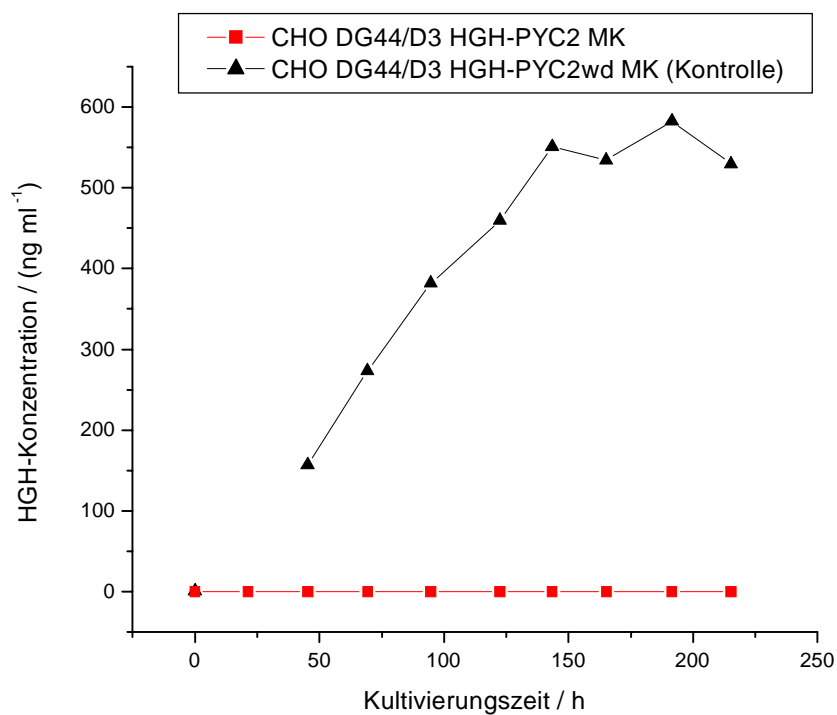


Abb. 3.3.8: Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von Human Growth Hormone bei der zweiten Batchkultivierung

3.3.4.2 HGH-Produktionsraten

Die HGH-Produktionsraten der Zelllinien CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK und CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK verhielten sich analog zum zeitlichen Verlauf der HGH-Konzentration im Kulturüberstand. Die Kontrollzelllinie wies in der frühen exponentiellen Phase der ersten Batchkultivierung eine maximale zellspezifische Produktionsrate von 341 fg d^{-1} auf (siehe Abb. 3.3.9), in der zweiten Batchkultur lag die maximale zellspezifische Produktionsrate bei 182 fg d^{-1} (siehe Abb. 3.3.10).

Die zellspezifischen HGH-Produktionsrate der mit dem PYC2-Gen transfizierten Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK lag in der frühen exponentiellen Phase im ersten Kultivierungsexperiment lediglich bei 10 fg d^{-1} (siehe Abb. 3.3.9) und war damit um den Faktor 34 geringer als diejenige der Kontrollzelllinie. In der zweiten Batchkultivierung wies diese Zelllinie eine vernachlässigbar geringe zellspezifische HGH-Produktionsrate auf; sie lag unterhalb von $0,1 \text{ fg d}^{-1}$ (siehe Abb. 3.3.10) und war damit um den Faktor 1820 geringer als die zellspezifische HGH-Produktionsrate der Kon-

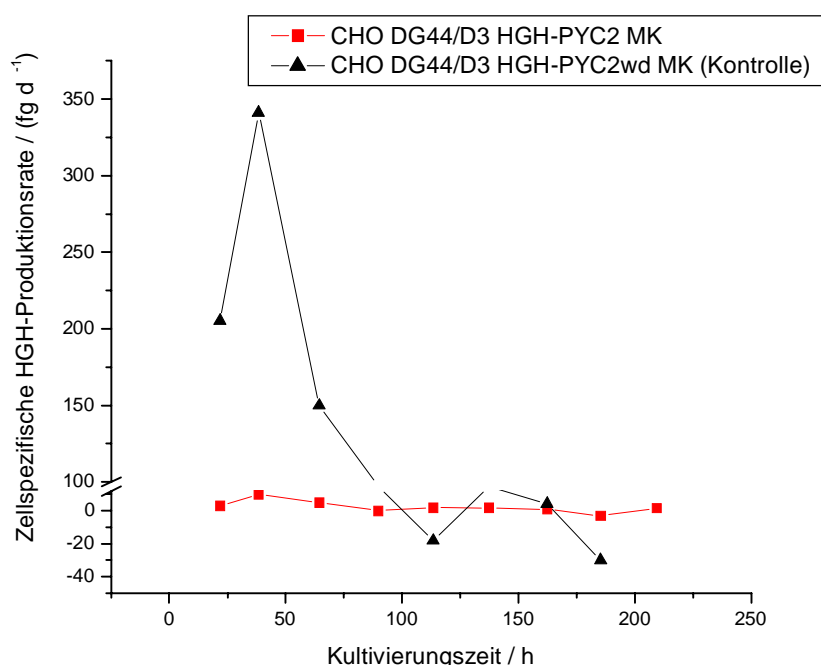


Abb. 3.3.9: Zellspezifische HGH-Produktionsraten - erste Batchkultivierung

trollzelllinie in der frühen exponentiellen Wachstumsphase.

Die HGH-Produktion beider Zelllinien war bei der zweiten Batchkultivierung geringer als beim ersten Kultivierungsexperiment.

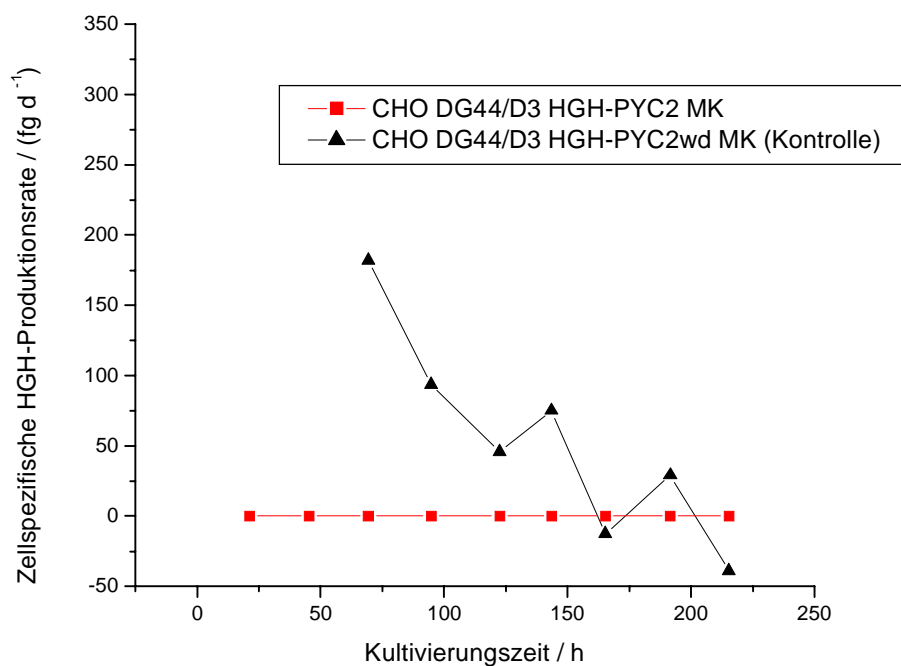


Abb. 3.3.10: Zellspezifische HGH-Produktionsraten - zweite Batchkultivierung

Die extrem geringe HGH-Produktion der mit dem PYC2-Gen transfizierten Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK kann mehrere Ursachen haben. Dieses Phänomen wird ausführlich in Kapitel 4 diskutiert.

3.3.5 Nukleotidpools

Nukleotide stellen eine wichtige Substanzklasse im Zellmetabolismus dar. Neben ihrer Funktion als aktivierte Vorstufen bei der Nukleinsäuresynthese sind sie bei der Regulation vieler Stoffwechselwege von Bedeutung. Veränderungen des Nukleotidpools ermöglichen Rückschlüsse auf den physiologischen Zustand der Zelle und das Wachstumsverhalten (Wylegalla et al., 1985; Ryll und Wagner, 1992).

3.3.5.1 Untersuchung des Wachstumsverhaltens durch Bestimmung des NTP- und U-Werts

In diesem Kapitel werden die NTP-Werte, U-Werte sowie NTP/U-Werte (vergleiche 2.5.3) dargestellt, die aus den Nukleotidpools der Zelllinien CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK und CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK ermittelt wurden. Aus diesen drei Quotienten kann auf das Wachstumsverhalten von Säugerzelllinien geschlossen werden (Ryll und Wagner, 1992).

Der NTP-Wert stellt den Quotienten aus der Summe der Purin- und Pyrimidintriphosphate dar (siehe Gleichung 2.5.4). In Abb. 3.3.11 ist der zeitliche Verlauf der NTP-Werte aufgezeigt. Sowohl bei der mit dem PYC2-Gen transfizierten Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK als auch bei der nicht mit diesem Gen transfizierten Kontrollzelllinie nahm dieser Wert während der ersten 100 Stunden Kultivierungszeit in beiden Batchkultivierungen kaum Veränderungen an. Dieses Verhalten ist charakteristisch für die exponentielle Wachstumsphase (Ryll und Wagner, 1992). Nach 100 Stunden Kulturdauer stieg der NTP-Wert in beiden Zelllinien an. Dieser Anstieg signalisiert die Phase reduzierten exponentiellen Wachstums der Satzkultur (Ryll und Wagner, 1992).

Während der ersten Batchkultivierung stieg der NTP-Wert bei der PYC2-Zelllinie von 2 auf 4,3. Bei der Kontrollzelllinie lag der finale NTP-Wert mit 5 nur geringfügig höher. Während des zweiten Kultivierungsexperiments war bei beiden Zelllinien ein Anstieg des NTP-Werts von 2,1 auf 4 zu erkennen; somit konnte kein Unterschied bei der PYC2-Zelllinie und der Kontrolle festgestellt werden.

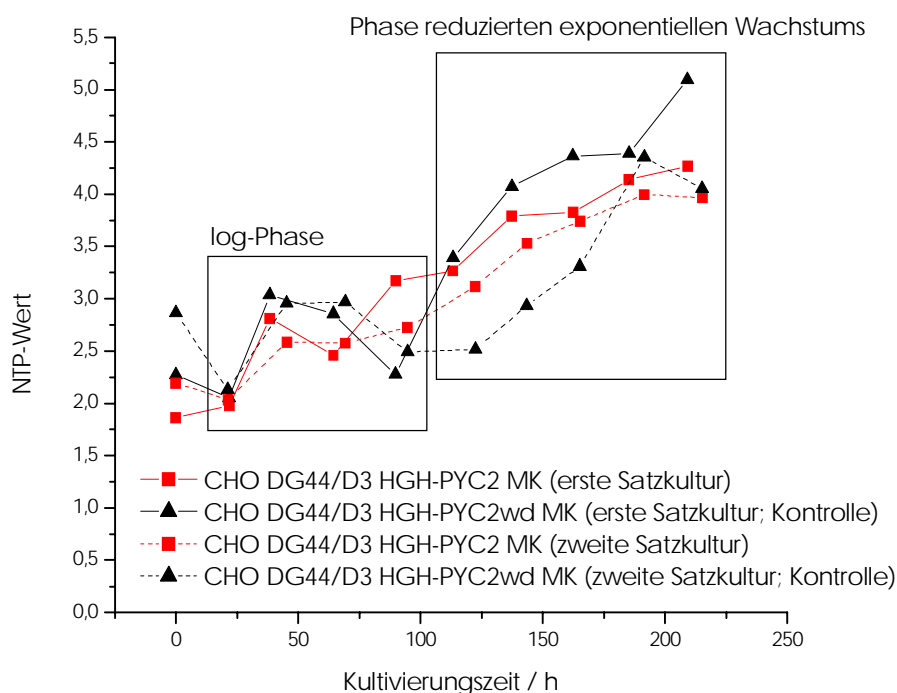


Abb. 3.3.11: Zeitlicher Verlauf des NTP-Werts

In der Abbildung sind die log-Phase sowie die Phase reduzierten exponentiellen Wachstums erkennbar. Bis ca. 100 Stunden Kulturdauer ist der NTP-Wert nahezu konstant (log-Phase), danach steigt er bis zum Ende der Kultivierung (Phase reduzierten exponentiellen Wachstums).

Der zeitliche Verlauf des U-Werts ist in Abb. 3.3.12 dargestellt. Dieser Wert gibt das Verhältnis zwischen dem UTP- und dem UDPGNac-Pool wieder (siehe Gleichung 2.5.5). Umgekehrt zum Verlauf des NTP-Werts steigt der U-Wert in der Adaptationsphase an und verändert sich kaum in der exponentiellen Wachstumsphase; zu Beginn der stationären Phase ist eine Verringerung des U-Werts zu beobachten (Ryll und Wagner, 1992).

Dieses Verhalten des U-Werts ist sehr gut in Abb. 3.3.12 zu erkennen, insbesondere bei der Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK in der zweiten Batchkultur. Der geringe U-Wert zu Beginn der Batchkultur zeigt an, dass die Zellen sich in der Adap-

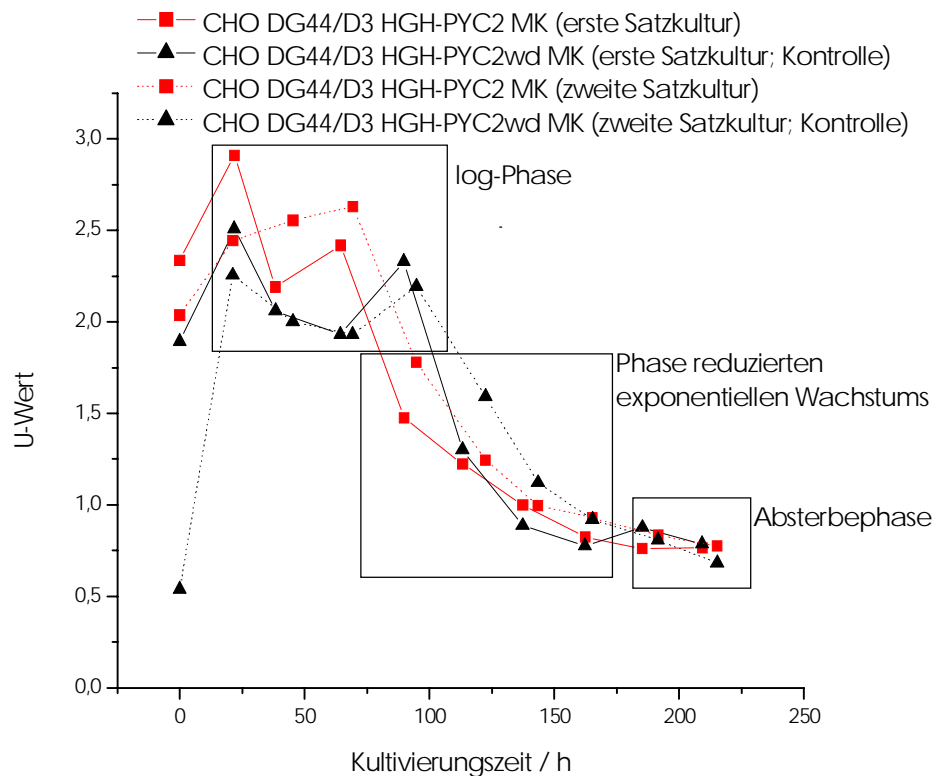


Abb. 3.3.12: Zeitlicher Verlauf des U-Werts

In dieser Abbildung sind die log-Phase, die Phase reduzierten exponentiellen Wachstums und die Absterbephase zu erkennen. Nach ca. 100 Stunden (Ende der log-Phase) sinkt der U-Wert (Phase reduzierten exponentiellen Wachstums) und nimmt ab ca. 180 Stunden Kulturdauer einen nahezu konstanten Wert an (Absterbephase).

tationsphase befanden. Nach ca. 100 Stunden Kulturdauer sank der U-Wert bei beiden Zelllinien; diese Verringerung des U-Werts spiegelt das Ende der exponentiellen Phase und den Beginn der stationären Phase wider. Ab ungefähr 180 Stunden Kulturdauer war der U-Wert nahezu konstant; dies zeigt den Beginn der Absterbephase.

Analog zum zeitlichen Verlauf des NTP-Werts waren auch beim zeitlichen Verlauf des U-Werts keine Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien zu erkennen. Innerhalb der ersten 80 Stunden Kultivierungszeit lag der U-Wert bei der mit dem PYC2-Gen

transfizierten Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK geringfügig höher als bei der Kontrollzelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK. Nach 3 Tagen Kultivierung sank der U-Wert bei beiden Zelllinien.

In Abb. 3.3.13 ist der zeitliche Verlauf des NTP/U-Werts dargestellt. Dieser Wert ist

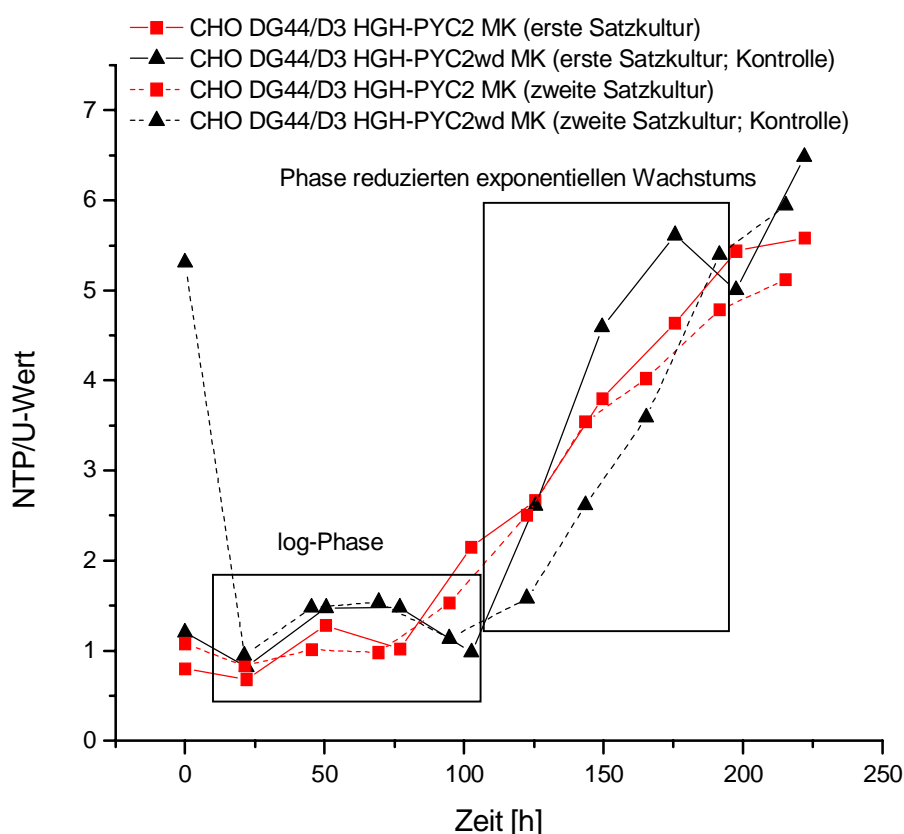


Abb. 3.3.13: Zeitlicher Verlauf des NTP/U-Werts

Diese Darstellung ermöglicht eine präzise Abgrenzung der log-Phase und der Phase reduzierten exponentiellen Wachstums durch Kombination der gegenläufigen NTP- und U-Werte.

der Quotient aus dem NTP- und dem U-Wert (siehe Gleichung 2.5.6). Der zeitliche Verlauf des NTP/U-Werts ermöglicht eine deutlichere Abgrenzung der Wachstumsphasen, da hierbei die gegenläufigen NTP- und U-Werte miteinander kombiniert werden (Ryll und Wagner, 1992).

In Abb. 3.3.13 sind keine Unterschiede des Wachstumsverhaltens der beiden Zelllinien CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK und CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK zu erkennen. Auffällig ist der vergleichsweise hohe NTP/U-Wert von 5,3, den die Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK zu Beginn der zweiten Satzkultur aufwies. Dieser hohe NTP/U-Wert zeigt an, dass sich diese Zelllinie in der Adaptationsphase befand (Ryll und Wagner, 1992).

Der NTP/U-Wert sank bei beiden Zelllinien nach zwei Tagen Kulturdauer auf einen Wert von ungefähr 1. Dieses Absinken ist charakteristisch für die Adaptationsphase (Ryll und Wagner, 1992). Der NTP/U-Wert veränderte sich danach kaum bis zum sechsten Tag der Kulturdauer. Dies zeigt die exponentielle Wachstumsphase an (Ryll und Wagner, 1992). Nach sechs Tagen Kulturdauer stieg der NTP/U-Wert linear an bis zum neunten Tag der Satzkultur. Dieses Verhalten ist charakteristisch für die Phase reduzierten exponentiellen Wachstums, die allein aus der Zellzählung nur unzureichend ermittelt werden kann (vergleiche Abb. 3.3.2; Ryll und Wagner, 1992).

Unterschiede im Wachstumsverhalten der beiden Zelllinien CHO DG44/D3 HGH/PYC2 MK und CHO DG44/D3 HGH/PYC2wd MK sind aus dem zeitlichen Verlauf des NTP/U-Werts nicht zu erkennen.

3.3.5.2 Zellspezifische ATP- und GTP-Konzentration

In Abb. 3.3.14 und Abb. 3.3.15 sind die zeitlichen Verläufe des ATP- bzw. des GTP-Pools der Zelllinien CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK und CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK aufgezeigt.

Die Purinnukleotide ATP und GTP sind repräsentativ für das zelluläre Energieniveau. In den Abbildungen 3.3.14 und 3.3.15 sind keine Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien CHO DG44/D3 HGH/PYC2 MK und CHO DG44/D3 HGH/PYC2wd MK zu erkennen; lediglich am letzten Tag der Kultivierung wies die Zelllinie CHO DG44/D3 HGH/PYC2 MK höhere zellspezifische ATP- und GTP-Konzentrationen auf. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit dem zeitlichen Verlauf der zellspezifischen Glucose- und Glutaminverbrauchsraten (siehe Abb. 3.3.4 und 3.3.6).

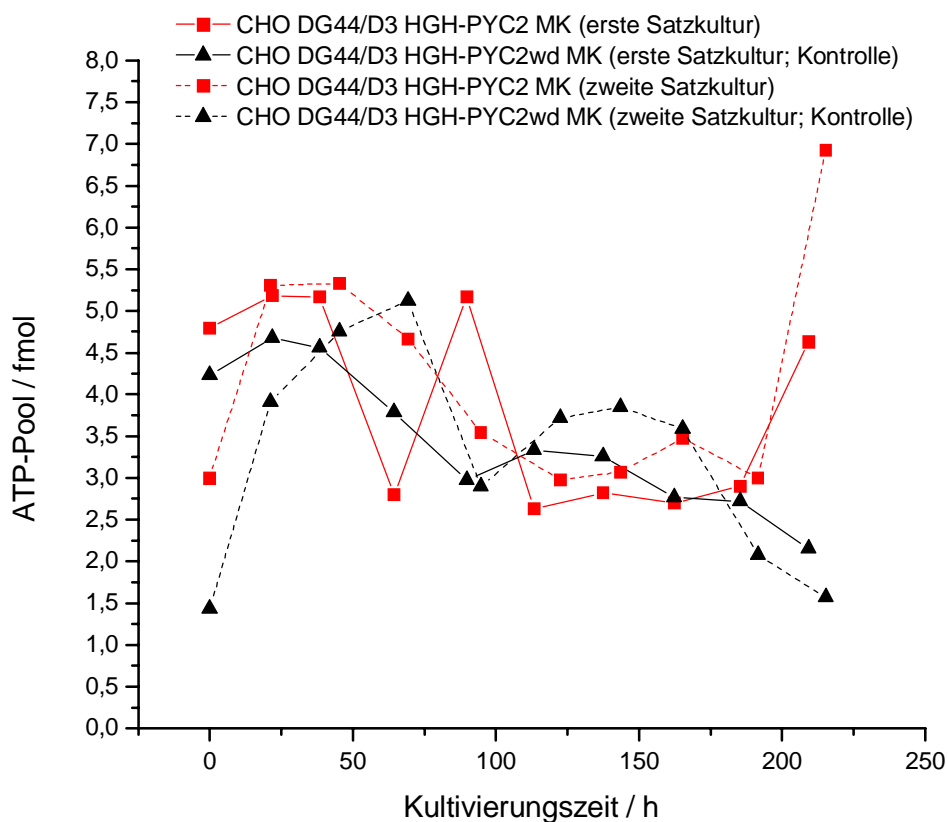


Abb. 3.3.14: Zeitlicher Verlauf des ATP-Pools

3.3.5.3 Bestimmung des UDPGNac-Pools

Der UDPGNac-Pool ist der intrazelluläre Gehalt der N-acetylierten Hexosamine UDPGlucNAc und UDPGalNAc. Diese beiden Nukleotidzucker stehen über die UDP-N-Acetyl-D-glucosamin-4-Epimerase im Gleichgewicht (Pels Rijcken et al., 1995). Durch die Akkumulation von Ammonium steigt der intrazelluläre UDPGNac-Gehalt im Verlauf einer Satzkultur an (Ryll und Wagner, 1992). Ein erhöhter UDPGNac-Pool beeinflusst das Glycosylierungsmuster vieler Zellproteine (Pels Rijcken et al., 1995; Gawlitzek et al., 1998; Grammatikos et al., 1998).

In Abb. 3.3.16 ist der zeitliche Verlauf des intrazellulären UDPGNac-Gehalts der

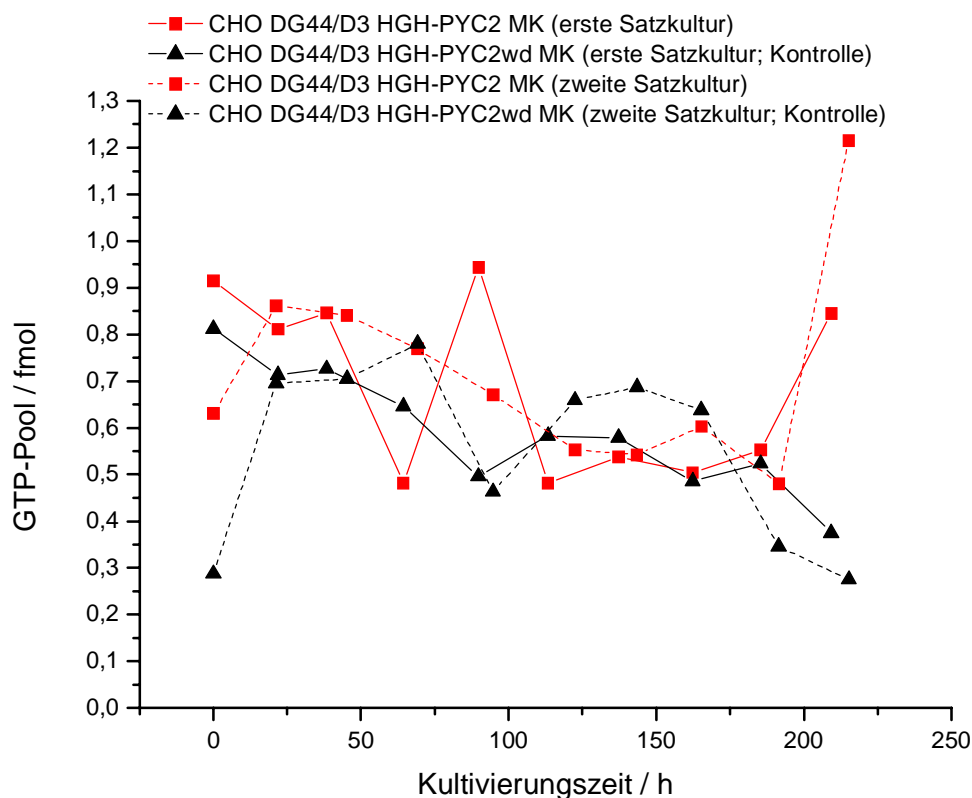


Abb. 3.3.15: Zeitlicher Verlauf des GTP-Pools

Zelllinien CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK und CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK dargestellt. In dieser Abbildung ist kein Unterschied im zeitlichen Verlauf des zellspezifischen UDPGNac-Gehalts zwischen der mit dem PYC2-Gen transfizierten Zelllinie und der Kontrollzelllinie zu erkennen. Am letzten Tag der Kultivierung wies die Zelllinie CHO DG44/D3 HGH/PYC2 MK höhere UDPGNac-Pools auf als die Kontrolle. Dieser Unterschied wurde ebenfalls beim Vergleich des zeitlichen Verlaufs des ATP- und GTP-Pools beobachtet (vergleiche Abb. 3.3.14 und Abb. 3.3.15).

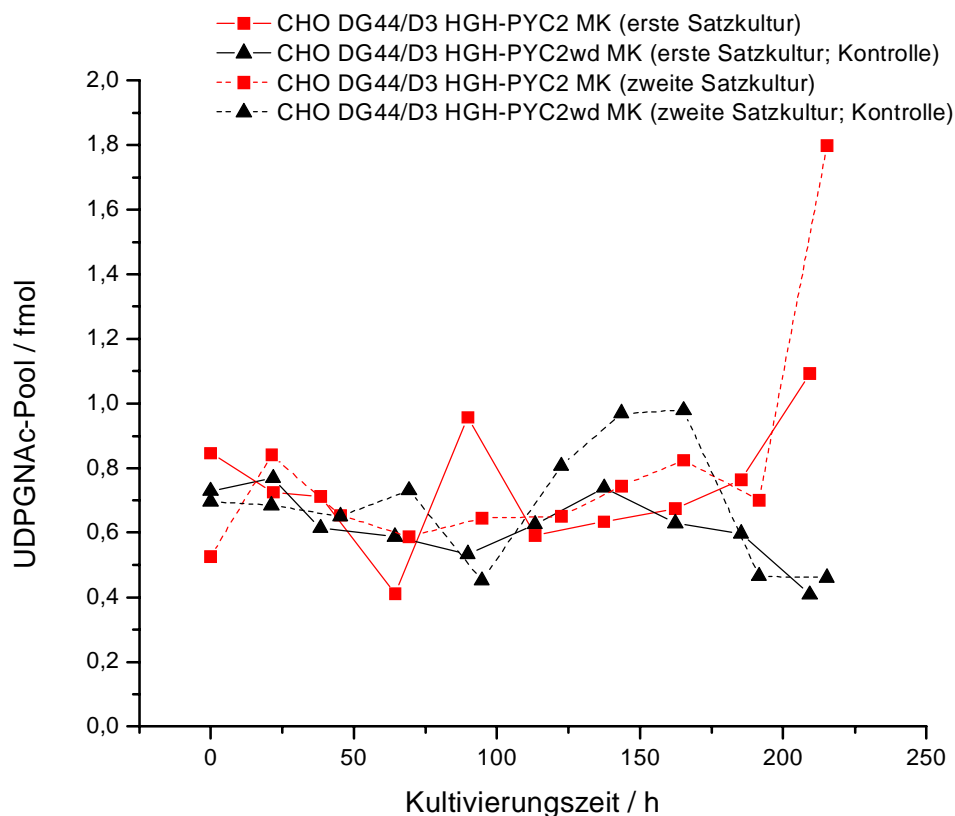


Abb. 3.3.16: Zeitlicher Verlauf des UDPGNac-Pools

3.3.6 Überblick

Die Transfektion der Zelllinie CHO DG44/D3 mit den bicistronischen Plasmiden pSBC-1/2-HGH/PYC2 und pSBC-1/2-HGH/PYC2wd konnte erfolgreich durchgeführt werden. Die beiden entstandenen Zelllinien CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK und CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK produzierten in zwei Satzkulturen das Modellprotein Human Growth Hormone, dessen Gen auf den beiden bicistronischen Plasmiden lokalisiert ist.

Allerdings konnte in der Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK, in die zusätzlich zum HGH-Gen das Gen für die rekombinante Pyruvat-Carboxylase 2 aus der Hefe *Sac-*

Saccharomyces cerevisiae eingeführt wurde, keine Aktivität dieses Enzyms nachgewiesen werden.

Die Einführung des Gens für die Pyruvat-Carboxylase 2 in die Zelllinie CHO DG44/D3 bewirkte weder eine Optimierung des Energiestoffwechsels noch eine Steigerung der Produktion des Modellproteins.

Die Transfektion der Zelllinie CHO DG44/D3 mit dem bicistronischen Plasmid pSBC-1/2-HGH/PYC2 und die darauf folgende Amplifikation mit Methotrexat hatte im Vergleich zu der Kontrollzelllinie, die aus der Transfektion der Zelllinie CHO DG44/D3 mit dem bicistronischen Plasmid pSBC-1/2-HGH/PYC2wd und anschließender Amplifikation mit Methotrexat hervorgegangen ist, keine Optimierung des Wachstums und der Viabilität zur Folge.

Die Verbrauchsrate der Substrate Glucose und Glutamin sowie die Lactatproduktionsrate der Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK wurden im Vergleich zur Kontrolle nicht verringert.

Die Produktion des Modellproteins Human Growth Hormone war bei der Kontrollzelllinie, die keine PYC2 exprimiert, in beiden Kultivierungen deutlich stärker als bei der mit dem PYC2-Gen transfizierten Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK. Während des ersten Kultivierungsexperiments lag die zellspezifische Produktionsrate um den Faktor 3,4 höher als bei der mit dem PYC2-Gen transfizierten Zelllinie. In der zweiten Batchkultivierung fiel die HGH-Produktion bei der Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK so niedrig aus, dass die zellspezifische HGH-Produktionsrate um den Faktor 1800 geringer war als bei der Kontrolle.

Die Analyse der Nukleotidpools ergab keine Unterschiede zwischen den Zelllinien CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK und CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK. Aus der Bestimmung der NTP- und U-Werte waren keine Differenzen im Wachstumsverhalten der beiden Zelllinien zu erkennen. Auch die ATP- und UDPGNac-Pools der beiden Zelllinien zeigten ebenfalls keine Unterschiede.

In Kapitel 4 werden die Transfektion der Zelllinie CHO DG44/D3 mit dem bicistronischen Plasmid mit den Genen für das Modellprotein Human Growth Hormone und

Pyruvat-Carboxylase 2 und die Ergebnisse aus den zwei Satzkulturen ausführlich diskutiert.

4 Diskussion

Der primäre Energiestoffwechsel kontinuierlicher Säugetierzelllinien unterscheidet sich vom Energiemetabolismus primärer Zellen (Donnelly und Scheffler, 1976; Reitzer et al., 1979; Zielke et al., 1984; Glacken et al., 1988; Lanks und Li, 1988; Fitzpatrick et al., 1993; Petch und Butler, 1994). Durch die unvollständige Oxidation des Substrats Glucose weisen kontinuierliche Säugerzelllinien einen übermäßig hohen Bedarf an Energiequellen auf, vor allem an Glutamin (Reitzer et al., 1979; Zielke et al., 1984; Petch und Butler, 1994). Zudem werden die toxischen Nebenprodukte Lactat und Ammonium im Kulturüberstand akkumuliert. Dies führt zu einer Verringerung der Zellvitalität und Verminderung der Produktqualität (Lanks, 1987; Glacken, 1988; Newland et al., 1990; Omasa et al., 1992; Goergen et al., 1994; Petch und Butler, 1994; Lao und Toth, 1997).

Die Defekte innerhalb des Energiestoffwechsels kontinuierlicher Säugetierzelllinien sind seit längerer Zeit bekannt (Fiechter und Gmünder, 1989; Fitzpatrick et al., 1993; Petch und Butler, 1994; Neermann und Wagner, 1996; Vriezen et al., 1998). Dennoch wurden bislang nur wenige Versuche unternommen, diese Defekte durch Veränderung des Stoffwechsels (*Metabolic Engineering*) zu beheben. Der Energiemetabolismus wird vielfach als zu komplex angesehen um gezielte metabolische Veränderungen herbeizuführen (Stephanopoulos und Vallino, 1991). Eine einzige Veränderung würde eine Kette von weiteren Reaktionen bewirken, die sich unter Umständen letal auswirken könnten.

Neermann (1996) identifizierte die Hexokinase als das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Glycolyse. Er klonierte die low- K_M -Hexokinase I aus Rattenhirn in eine BHK-Zelllinie und erhöhte auf diese Weise die Gendosis für die Hexokinase. Die verstärkte Aktivität dieses Enzyms in der rekombinanten BHK-Zelllinie führte zu einem verstärkten Glycolyseflux. In Folge dessen wurde der zelluläre ATP-Gehalt verdreifacht und dadurch die Produktivität um den gleichen Faktor erhöht. Jedoch bewirkte die verstärkte Hexokinaseaktivität außerdem eine Steigerung der Lactatproduktion und eine Verringerung der Wachstumsrate, die unter anderem von einem erhöhten UDPGNAC-Pool (Neermann, 1996) sowie einem verminderten Glucoseflux in den Pentose-

phosphatweg begleitet wird (Zielke et al., 1978; Reitzer et al., 1979). Es ist bisher jedoch nicht eindeutig geklärt worden, ob diese Veränderungen allein für die Verminderung der Wachstumsrate verantwortlich sind. Die Erhöhung des UDPGNac-Pools ist jedoch unmittelbar mit einer erhöhten Akkumulation von Ammonium verbunden (Ryll, 1992; Ryll et al., 1994; Gawlitzek et al., 1998; Grammatikos et al., 1998). Neermann (1996) demonstrierte, dass *Metabolic Engineering* des Primärstoffwechsels möglich ist, ohne dass der Zelltod herbeigeführt wird.

Die Expression der low- K_M -Hexokinase I bewirkte, wie oben dargestellt, eine Verdreifachung des ATP-Pools in einer BHK-Zelllinie. Dieses Resultat führte zur Hypothese und Technik der Expression der Pyruvat-Carboxylase 2 (PYC2) aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* in Säugetierzellen, die im Folgenden beschrieben wird.

Irani et al. (1999) gelangen die Einführung der Pyruvat-Carboxylase 2 (PYC2) aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* in eine BHK-Zelllinie und damit eine Verbindung der Stoffwechselwege Glycolyse und Citratzyklus. Diese Arbeit basiert auf den Analysen von Neermann (1996), der keine Enzymaktivitäten der drei Enzyme feststellen konnte, die die Glycolyse mit dem Citratzyklus verbinden. Diese Enzyme sind der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex, die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase und die Pyruvat-Carboxylase. Einige Autoren sehen eine irreversible Phosphorylierung dieser Enzyme als die Ursache der unterbundenen Enzymaktivität (Randle et al., 1984; Murray et al., 1992). Durch eine Steigerung der Gendosis eines dieser bereits vorhandenen Enzyme würde ebenfalls durch die Phosphorylierung die Enzymaktivität vermindert oder aufgehoben werden. Irani et al. (1999) umgingen dieses Problem durch Einbringung eines speziefremden Enzyms. Die Pyruvat-Carboxylase 2 aus *Saccharomyces cerevisiae* ist im Cytosol lokalisiert. Durch ihre Klonierung in die BHK-Zelllinie wurde nicht die Gendosis eines vorhandenen Enzyms erhöht, sondern ein neuer Stoffwechselweg geschaffen. Auf diese Weise konnte die Glucoseverbrauchsrate der erfolgreich transfizierten Zellen um den Faktor 4 gesenkt werden, die Lactatproduktionsrate um den Faktor 2,7. Die Glutaminverbrauchsrate wurde um die Hälfte erniedrigt (Irani, 2000). Nach der Transfektion eines rekombinanten PYC2-exprimierenden Zellklons mit dem Modellprotein Erythropoietin (EPO) erfolgte im Vergleich zur nicht PYC2-exprimieren-

den Kontrollzelllinie eine Steigerung der Produktivität in kontinuierlicher Kultivierung unter Substratlimitierung, und die Produktionszeit von EPO konnte um 30 % verlängert werden (Irani, 2000; Irani et al., 2002). Die Strategie der Einführung der rekombinanten Hefe-Pyruvat-Carboxylase 2 in Säugetierzelllinien ist patentiert worden (Wagner et al., 1998).

Zur Produktion rekombinanter komplexer Proteine werden heutzutage vorwiegend DHFR-negative Zelllinien verwendet, insbesondere die Zelllinie CHO DG44 (Kim et al., 1998). Diese Zelllinie ist durch irreversible Entfernung der für das Enzym Dihydrofolat-Reductase codierenden Allele entstanden (Urlaub et al., 1983). Wird CHO DG44 mit dem Gen für das Modellprotein und dem Gen für Dihydrofolat-Reductase cotransfiziert, so können durch anschließende Zugabe von Methotrexat zum Nährmedium beide Gene amplifiziert werden (vergleiche 1.6). Auf diese Weise ist mit CHO DG44-Zellen eine deutlich höhere Produktivität möglich als mit anderen kontinuierlichen Säugetierzelllinien. Diese Zelllinie ist die derzeit wichtigste Produktionszelllinie in der pharmazeutischen Industrie.

Die Applikation der oben beschriebenen PYC2-Strategie auf die Zelllinie CHO DG44 fand großes Interesse bei der pharmazeutischen Industrie. Dies ermöglichte die vorliegende Arbeit, die ein gemeinsames Projekt der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) und der Firma Novo Nordisk A/S, Gentofte, Dänemark, darstellt. Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Optimierung des Energiemetabolismus und der Produktion einer CHO DG44-Zelllinie (CHO DG44/D3, siehe 2.1.1.1.1) durch Transfektion mit dem Gen für die Pyruvat-Carboxylase 2 aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Nach der Transfektion von CHO DG44 mit PYC2 und der sich anschließenden Analyse des Energiemetabolismus sollte ein Vergleich mit den Ergebnissen stattfinden, die mit BHK-Zellen erzielt worden sind (Irani et al., 1999; Irani, 2000). Zudem sollte ein bicistronisches Plasmid konstruiert werden, das die Gene für das Modellprotein Human Growth Hormone und Pyruvat-Carboxylase 2 trägt. Durch die Transfektion von CHO DG44 mit diesem Plasmid ist die Möglichkeit zur Amplifikation sowohl des Modellproteins als auch der PYC2 gegeben. Die gemeinsame Amplifikation dieser beiden Gene ermöglicht sowohl die Optimierung der Produktivität als auch die

Optimierung des Energiestoffwechsels von CHO DG44.

4.1 Expression der Pyruvat-Carboxylase 2 in der Zelllinie CHO DG44/D3 nach der Transfektion mit dem monoklonalen Vektor pCMVSHE-PYC2

Bislang sind außer der Expression der Pyruvat-Carboxylase 2 in kontinuierlichen Säugetierzelllinien nur wenige Versuche unternommen worden, ein Gen aus Hefen in Säugerzellen zu exprimieren. Ein solches Beispiel ist die Klonierung eines amber Suppressor tRNA^{Leu}-Gens (SUP53) in eine Säugerzelle (Ganguly et al., 1988). Häufiger wurden jedoch umgekehrt Gene aus Säugerzellen in niedrigeren Organismen wie Bakterien oder Hefen zur Expression gebracht.

4.1.1 Transkription des PYC2-Gens

Die Transkription des in die Zelllinie CHO DG44/D3 klonierten PYC2-Gens konnte durch Northern-Blot-Analyse nachgewiesen werden. Die einzelnen PYC2-Klone wiesen Transkripte auf, die sich hinsichtlich Länge, Anzahl und Intensität unterschieden. Das deutlichste Signal zeigte der CHO DG44/D3-Klon PYC2-B2. Die Northern-Blot-Analyse ergab bei diesem Klon ein Transkript von 10,2 kb, das mehr als doppelt so lang war wie das theoretisch erwartete von 3,7 kb.

Irani (2000) erzielte bei der Northern-Blot-Analyse der mit dem PYC2-Gen transfizierten BHK-Zelllinie ähnliche Ergebnisse. Die PYC2-Klone enthielten ebenfalls Transkripte unterschiedlicher Intensitäten und Längen. Der Klon BHK-21 A PYC2-K.10, der sich bei der Analyse des Energiemetabolismus als am deutlichsten optimiert herausstellte (Irani, 2000), wies ebenfalls ein Transkript mit einer Länge von ungefähr 10 kb auf. Irani verwendete zur Transfektion der BHK-Zellen den Vektor pCMVSHE-PYC2 (Irani, 2000), der auch zur Transfektion von CHO DG44/D3 herangezogen

wurde.

Als Ursache der größeren Transkriptlänge bei der Northern-Blot-Analyse des Klon CHO DG44/D3 PYC2-B2 wurde zunächst vermutet, dass durch eine Punktmutation im PYC2-Gen oder durch eine Deletion eine Verschiebung des Stoppsignals in 3'-Richtung erfolgte. Somit würde bei der Transkription des PYC2-Gens eine längere mRNA entstehen. Zur Klärung dieser Vermutung wurden von den Firmen SeqLab (Göttingen, Deutschland) und Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA) zwei unabhängige Sequenzierungen des PYC2-Gens im Plasmid pCMVSHE-PYC2 durchgeführt. Die im Anhang der vorliegenden Arbeit dargestellten Resultate der Sequenzierungen wurden verglichen mit in der Literatur angegebenen PYC2-Sequenzen (Stucka et al., 1991; Val et al., 1995) sowie mit einer in der EMBL-Datenbank aufgeführten PYC2-Sequenz. Es konnten keine Gemeinsamkeiten der beiden Sequenzierungen festgestellt werden, die sich von allen drei in der Literatur beschriebenen PYC2-Sequenzen unterscheiden. Die von SeqLab und Eli Lilly festgestellte Basenzusammensetzung des PYC2-Gens ist mit mindestens einer der drei in der Literatur beschriebenen Sequenzen identisch. Von einer fehlerhaften Basenzusammensetzung des PYC2-Gens im Plasmid pCMVSHE-PYC2 wäre auszugehen, wenn eine von SeqLab und Eli Lilly ermittelte Base in allen drei in der Literatur beschriebenen Sequenzen an dieser Stelle des Gens einheitlich anders bestimmt ist. Es liegen also weder Punktmutationen noch Deletionen im Gen vor, und eine Verschiebung des Stoppsignals kann somit ausgeschlossen werden.

Als weitere Möglichkeit kam in Frage, dass es sich bei dem Signal bei 10,2 kb nicht um RNA handelt, sondern um doppelsträngige DNA, die bei der RNA-Isolierung nicht eliminiert wurde. Durch die Verwendung von zwei zueinander komplementären Oligonucleotiden als Sonden wurde jedoch gezeigt, dass es sich bei den Transkripten um einzelsträngige RNA handelt. Die Transkriptionsanalyse mit der zur PYC2-mRNA komplementären Sonde zeigte ebenfalls ein Transkript von 10 kb; die mit der nicht zur PYC2-mRNA komplementären Sonde durchgeführten Hybridisierungen ergaben kein Signal bei 10 kb, wie es im Falle doppelsträngiger DNA zu erwarten wäre (siehe 3.1.2). Die Transfektion der Zelllinie CHO DG44/D3 erfolgte mit zirkulären Plasmiden. Diese können sich an unterschiedlichen Stellen öffnen, bevor die Integration in das Wirts-

chromosom stattfindet (Koch-Brandt, 1993). Daher besteht die Möglichkeit, dass als Folge der Öffnung und damit der Linearisierung des Plasmids in der Wirtszelle die sich im zirkulären Plasmid hinter dem Gen befindende Terminationsstelle vor dem Promotor liegt. Bei der Integration des Plasmids in dieser Form würde die Transkription über das Stoppsignal hinaus ablaufen, bis eine endogene Terminationsstelle des Wirtschromosoms gefunden wird. Auf diese Weise entstehen "run-through"-Transkripte, die länger sein können als das eigentliche Gen.

Eine weitere Ursache für die Länge der Transkripte kann in der unvollständigen Prozessierung der mRNA liegen. Golf und Berg (1979) sowie Ganguly et al. (1988) zeigten, dass Transkripte eines aus *Saccharomyces cerevisiae* stammenden tRNA-Gens, das in Säugetierzellen eingebracht wurde, am 5'- und am 3'-Ende *in vivo* unvollständig prozessiert und gespleißt wurden, was die Autoren mit fehlerhaftem Transport zu den richtigen Subkompartimenten des Zellkerns erklären.

Die unterschiedlichen Intensitäten der Transkripte sind in der unterschiedlichen Expressionsstärke jedes einzelnen Klons begründet. Diese Expressionsstärke hängt von der Stabilität der Transfektion ab sowie von der Umgebung innerhalb des Wirtschromosoms (Devaux et al., 1985; Poljak et al., 1994).

Ein sicheres Signal für die Expression der rekombinanten PYC2 ist die Bestimmung der Aktivität des Enzyms oder der Nachweis des Proteins.

4.1.2 Enzymaktivität der PYC2

Zur Bestimmung der Enzymaktivität der Pyruvat-Carboxylase 2 aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde eine nach Atkin et al. (1979) und Irani (2000) modifizierte Methode verwendet.

Irani (2000) führte die Aktivitätsbestimmung durch Zugabe von Acetyl-CoA zum Rohextrakt zu, das als Aktivator für die rekombinante PYC2 dient, aber auch die native mitochondriale Pyruvat-Carboxylase (PC) aktivieren kann. Durch die Citrat-Synthase wurde das in der Pyruvat-Carboxylase-Reaktion entstandene radioaktiv markierte

Oxalacetat mit Acetyl-CoA zu Citrat kondensiert, das schließlich quantifiziert wurde. Mit dieser Methode gelang Irani (2000) ein Nachweis der nativen Pyruvat-Carboxylase, der bislang nicht erbracht werden konnte (Fitzpatrick et al., 1993; Petch und Butler, 1994; Neermann und Wagner, 1996; Vriezen, 1998). Die mit dieser Methode gemessene Aktivität der Pyruvat-Carboxylase lag bei dem Klon BHK-21 A PYC2-K.10 um den Faktor 1,7 höher als bei der Kontrolle, die nicht mit der rekombinanten PYC2 transfiziert worden war. Irani (2000) führte die höhere Enzymaktivität des PYC2-Klons auf die rekombinante PYC2 zurück, die nicht von der Kontrollzelllinie exprimiert wird.

Mit der von Irani (2000) verwendeten Methode kann bei der Aktivitätsbestimmung der Pyruvat-Carboxylase allerdings nicht zwischen der nativen mitochondrialen PC und der rekombinanten PYC2 differenziert werden, da beide Pyruvat-Carboxylasen durch Acetyl-CoA aktiviert werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode zur Bestimmung der Aktivität der Pyruvat-Carboxylase modifiziert, indem zum Rohextrakt Palmitoyl-CoA als Aktivator zugegeben wurde. Palmitoyl-CoA aktiviert die PYC2, es kann jedoch nicht die native mitochondriale PC aktivieren (Utter et al., 1975). Das in der Enzymreaktion entstandene radioaktiv markierte Oxalacetat wurde durch die Malat-Dehydrogenase zu Malat umgewandelt, das schließlich quantifiziert wurde.

Diese Methode wurde zunächst erfolgreich bei einem Rohextrakt der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* angewendet. Dieser Rohextrakt enthält die beiden Isoformen PYC1 und PYC2, die beide durch Palmitoyl-CoA aktiviert werden können (Utter et al., 1975). Mit dieser Methode war eine ausschließliche Aktivitätsbestimmung der rekombinanten PYC2 in Rohextrakten von Säugetierzelllinien möglich, die mit dem Gen für dieses Enzym transfiziert worden waren. Der Klon CHO DG44/D3 PYC2-B2 wies gegenüber der nicht mit PYC2 transfizierten Kontrolle eine fünfzehnfach höhere Enzymaktivität auf; die bei der Kontrolle bestimmte PYC2-Aktivität war vernachlässigbar gering. Dieses Ergebnis beweist die Expression der rekombinanten PYC2 in dem Klon CHO DG44/D3 PYC2-B2.

Die gemessenen Enzymaktivitäten dieses Klons korrelierten mit den Resultaten aus der Northern-Blot-Analyse.

4.1.3 Optimierung der PYC2-Expression

Zur Identifikation eines Klons mit hoher Expressionsrate wäre die Analyse mehrerer hundert Klone erforderlich (Wirth, 1997). Die Untersuchung der PYC2-Expression in allen Klonen würde somit eine Arbeitszeit von mehreren Monaten bedingen. In der vorliegenden Arbeit wurden zehn zufällig ausgewählte Einzelklone analysiert, von denen der CHO DG44/D3-Klon PYC2-B2 die höchste PYC2-Expression aufwies. Bei der Analyse mehrerer hundert Klone wäre das Auffinden eines Klons mit noch höherer PYC2-Expression wahrscheinlich.

Die Expression der PYC2 könnte durch die Verwendung eines anderen Klonierungsvektors verbessert werden. Mit der Entfernung des Spleißsignals unmittelbar vor dem Gen (Irani, 2000) könnte die PYC2-Expression verstärkt werden (Dr. Manfred Wirth, GBF, Abteilung Regulation und Differenzierung, Braunschweig, Deutschland, persönliche Mitteilung). Ein derartiger Klonierungsvektor wurde zur transienten Transfektion der Zelllinie HEK293 mit der PYC2 herangezogen; durch die Expression der PYC2 konnte die Lactatproduktion dieser Zelllinie verringert werden (Dr. Yves Durocher, Animal Cell Technology and Downstream Processing Group, National Research Council Canada, Montreal, Quebec, Canada, persönliche Mitteilung).

Die Effizienz der Transkription beeinflusst maßgeblich die Stärke der Expression eines Gens (Hauser, 1997). Zur genauen Analyse der Effizienz von Transkription und Translation müssten diese beiden Vorgänge *in vitro* mit zellfreien CHO DG44-Extrakten durchgeführt werden. Bei geringer Transkriptions- und Translationsrate wäre eine Optimierung durch Veränderung des Plasmidkonstrukts möglich. Eine Verbesserung der Transkription könnte durch die Wahl eines anderen Promotors und Enhancers erreicht werden. Auch durch den Einbau von *Scaffold Attached Regions* (SAR-Elementen) ist eine Steigerung der Genexpression möglich (Kehr et al., 1991).

Eine weitere Strategie zur Optimierung der PYC2-Expression stellt die zielgerichtete Integration (*site-specific integration*) des PYC2-Gens in bestimmte Stellen des Wirtsgenoms dar (Thyagarajan et al., 2001). Durch Auffinden von Stellen hoher Transkriptionsaktivität im Wirtschromosom und gezielte Integration des PYC2-Gens in diese

Loci könnte die PYC2-Expression deutlich verbessert werden. Diese Technik garantiert zudem eine bessere Reproduzierbarkeit der Transfektion, da die Integration des rekombinanten Gens nicht mehr zufällig erfolgt (*random integration*), sondern in eine bestimmte Stelle des Chromosoms (*site-specific integration*). Somit wäre auch ein genauerer Vergleich mehrerer Einzelklone möglich.

4.2 Wachstumsverhalten der Zelllinie CHO DG44/D3 nach der Transfektion mit dem monocistronischen Vektor pCMVSHE-PYC2

Die Klonierung der PYC2 in die Zelllinie CHO DG44/D3 mit dem Vektor pCMVSHE-PYC2 wirkte sich positiv auf das Wachstumsverhalten aus. Sowohl die Wachstumsrate als auch die maximal erreichte Zellkonzentration des Klons CHO DG44/D3 PYC2-B2 konnte im Vergleich zum nicht PYC2-exprimierenden Wildtyp erhöht werden. Allerdings führte das stärkere Wachstum der PYC2-exprimierenden Zellen zu einem früheren Erreichen der Absterbephase (vergleiche 3.1.3). Dieses Phänomen könnte mit einem zunehmenden Verbrauch von essentiellen Substanzen aus dem Nährmedium erklärt werden. Da CHO DG44-Zellen im Gegensatz zu BHK- oder CHO K1-Zellen keine Dihydrofolat-Reductase exprimieren und zum Wachstum auf die Zufuhr von Nucleosiden angewiesen sind, wurde zunächst die Limitierung eines oder mehrerer Nucleoside als Ursache für das frühere Erreichen der Absterbephase des PYC2-Klons CHO DG44/D3 PYC2-B2 vermutet. Bei der Quantifizierung der Nucleoside in den Kulturüberständen des Klons PYC2-B2 und der nicht mit PYC2 transfizierten Zelllinie CHO DG44/D3 pAG-MK konnten jedoch keine Unterschiede zwischen diesen beiden Zelllinien festgestellt werden.

Irani (2000) erzielte nach der Transfektion einer BHK-Zelllinie mit PYC2 andere Ergebnisse in Bezug auf das Zellwachstum. Die Expression der PYC2 hatte weder Auswirkungen auf die Wachstumsrate noch auf die maximal erreichte Zellkonzentration.

Allerdings konnte die stationäre Phase der mit PYC2 transfizierten BHK-Zellen im Vergleich zum nicht transfizierten Wildtyp verlängert werden.

4.3 Substratnutzung und Lactatproduktion der Zelllinie CHO DG44/D3 nach der Transfektion mit dem monoclonalen Vektor pCMVSHE-PYC2

4.3.1 Glucose- und Glutaminverbrauchsdaten

Die Expression der PYC2 in der Zelllinie CHO DG44/D3 wurde in dem Klon PYC2-B2 nachgewiesen. Die zellspezifischen Verbrauchsdaten des Substrats Glucose konnte durch die Expression der PYC2 in diesem Zellklon reduziert werden. Allerdings konnten keine Unterschiede beim Vergleich der zellspezifischen Glutaminverbrauchsdaten zwischen PYC2-B2 und der nicht mit dem PYC2-Gen transfizierten Kontrolle festgestellt werden. Unter der Voraussetzung, dass sich der Energiebedarf einer Zelle unter gleichen Kulturbedingungen nicht verändert, kann wegen des geringeren Verbrauchs des energieliefernden Substrats Glucose auf eine höhere substratbezogene Energieausbeute geschlossen werden. Der Abbau von einem Mol Glucose durch die Glycolyse liefert 2 Mol ATP. Bei der vollständigen Oxidation von Glucose zu CO_2 und H_2O können bis zu 36 Mol ATP gewonnen werden (Krebs, 1970; Stryer, 1990).

Die Nutzung der beiden energieliefernden Substrate Glucose und Glutamin sind miteinander gekoppelt (Zielke et al., 1978; Reitzer et al., 1979; Lanks, 1986; Glacken et al., 1988; Newland et al., 1990). Bei dem CHO DG44/D3-Klon PYC2-B2 ist der Glucoseverbrauch reduziert worden, Unterschiede bezüglich des Glutaminverbrauchs konnten im Vergleich zur Kontrolle jedoch nicht festgestellt werden. Der verringerte Verbrauch eines der beiden energieliefernden Substrate ist nicht durch einen erhöhten Verbrauch des anderen Substrats kompensiert worden.

Die angestrebte Reduktion des Glutaminverbrauchs ist durch die Expression der PYC2 in der Zelllinie CHO DG44/D3 nicht erreicht worden. Ein geringerer Verbrauch dieses

Substrats würde eine Reduktion der Zugabe von Glutamin zum Kulturmedium ermöglichen; dadurch kann die Akkumulation von Ammonium verringert werden (Tritsch und Moore, 1962; Negrotti et al., 1989). Ammonium wirkt einerseits toxisch auf Säugetierzellen (Glacken et al., 1986; Lanks, 1987; Ozturk et al., 1992), andererseits beeinflusst es auch die Proteinglycosylierung (Goochee und Monica, 1990; Gawlitzek et al., 1998; Grammatikos et al., 1998; Valley et al., 1999). Somit kann eine verringerte Zugabe der Aminosäure Glutamin zum Kulturmedium zu einer Verbesserung der Produktqualität und -integrität beitragen.

Möglicherweise kann eine höhere PYC2-Expression als bei CHO DG44/D3 PYC2-B2 einen geringeren Glutaminverbrauch bewirken. Irani et al. (1999) und Irani (2000) konnten eine geringere zellspezifische Glutaminverbrauchsrate durch Klonierung der PYC2 in eine BHK-Zelllinie realisieren. Diese Resultate werden in 4.3.3 diskutiert.

4.3.2 Lactatproduktionsraten

Hohe Lactatkonzentrationen im Kulturüberstand können das Zellwachstum und die Produktivität von Säugetierzelllinien beeinflussen (Lanks, 1987; Omasa et al., 1992; Goergen et al., 1994; Lao und Toth, 1997). Übermäßige Lactatproduktion führt zu starker Ansäuerung des Kulturmediums. In industriellen Prozessen wird eine dadurch bedingte Reduktion des pH-Werts durch Titration mit einer Base verhindert. Diese Zugabe bewirkt eine erhöhte Osmolalität des Kulturmediums, die die Zelllysis herbeiführen kann (Omasa et al., 1992; Reddy et al., 1992; Oh et al., 1993; Oyaas et al., 1994; Reddy und Miller, 1994; Ryu und Lee, 1997; Ryu et al., 1999).

Die Analyse der Lactatproduktion der PYC2-exprimierenden Klone, die aus der Transfektion der Zelllinie CHO DG44/D3 mit dem Vektor pCMVSHE-PYC2 hervorgegangen sind, zeigte keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollzelllinie CHO DG44/D3 pAG-MK, die nicht mit dem PYC2-Gen transfiziert worden war (siehe 3.1.4.2). Die Expression der PYC2 konnte in dem Klon CHO DG44/D3 PYC2-B2 nachgewiesen werden. Obwohl dieser Klon weniger Glucose verbrauchte als die Kontrolle konnten bezüglich

der Lactatproduktion keine Unterschiede zur Kontrollzelllinie festgestellt werden. Lactat entsteht aus Pyruvat über die Lactat-Dehydrogenase, wobei NADH zu NAD⁺ oxidiert wird (Stryer, 1990). In kontinuierlichen Säugetierzelllinien wird durch diese Reaktion NAD⁺ regeneriert, das in der Glycolyse verbraucht wird (Lanks, 1986). Das Substrat für die Lactat-Dehydrogenase, Pyruvat, entsteht jedoch nicht ausschließlich durch die Glycolyse, sondern auch durch den Katabolismus einiger Aminosäuren (vergleiche Abb. 1.2.2) und aus Malat durch das Malat-Enzym (Stryer, 1990). Somit könnte die Lactatproduktion des Klons PYC2-B2 bei verringertem Glucoseverbrauch mit einem verstärkten Katabolismus von Aminosäuren zu Pyruvat erklärt werden.

4.3.3 Vergleich von Substratverbrauch und Lactatproduktion der PYC2-exprimierenden Zelllinien CHO DG44/D3 und BHK-21 A

Die Expression der PYC2 in der Zelllinie CHO DG44/D3 führte verglichen mit dem nicht transfizierten Wildtyp zu verminderten Glucoseverbrauchsraten. Allerdings konnten keine Unterschiede bezüglich der Glutaminverbrauchs- und Lactatproduktionsraten festgestellt werden. Bei dem Klon CHO DG44/D3 PYC2-B2 wurde die Expression der rekombinanten PYC2 nachgewiesen. Dieser Klon wies 1,4-fach geringere Glucoseverbrauchsraten auf als die Kontrollzelllinie, die nicht das PYC2-Gen trägt. Für den folgenden Vergleich mit den Ergebnissen von Irani et al. (1999) und Irani (2000) werden die Resultate der Analysen mit dem Klon CHO DG44/D3 PYC2-B2 herangezogen.

Irani et al. (1999) und Irani (2000) exprimierten die PYC2 in einer BHK-21 A-Zelllinie. Zur Transfektion wurde ebenfalls der Vektor pCMVSHE-PYC2 verwendet. Die Unterschiede zwischen den PYC2-Klonen und der Wildtypzelllinie waren bezüglich des Substratverbrauchs und der Lactatproduktion deutlich stärker ausgeprägt als bei der Zelllinie CHO DG44/D3. Der Glucoseverbrauch wurde bei den PYC2-exprimierenden BHK-21 A-Zellen um den Faktor 4 reduziert, der Glutaminverbrauch um den Faktor 2,3. Die Lactatproduktion konnte um den Faktor 2,4 verringert werden.

Die Unterschiede bei der Optimierung der Zelllinien BHK-21 A und CHO DG44/D3

durch die Klonierung der PYC2 sind vor allem auf den wesentlich höheren Bedarf der BHK-Wildtypzelllinie an Substraten zurückzuführen und auf deren im Vergleich zur CHO-Zelllinie stärkere Lactatproduktion (Irani, 2000).

Tabelle 4.1 stellt die Resultate für die beiden Zelllinien gegenüber. In der Tabelle sind die zellspezifischen Raten für die nicht PYC2 exprimierende Wildtypzelllinie sowie die optimierten Raten aufgezeigt.

Zunächst fallen die erheblichen Unterschiede der zellspezifischen Raten der nicht mit PYC2 transfizierten Zelllinien auf. Die zellspezifische Lactatproduktionsrate der BHK-Zelllinie ist mehr als doppelt so groß wie diejenige der CHO-Zelllinie. Die Lactatproduktion der nicht das PYC2-Gen tragenden Zelllinie CHO DG44/D3 pAG-MK liegt im Bereich der PYC2-Klone von BHK-21 A.

Die zellspezifische Glucoseverbrauchsrate von BHK-21 A pAG-MK ist nahezu doppelt so hoch wie bei CHO DG44/D3 pAG-MK. Lediglich in Bezug auf den Glutaminverbrauch weisen die beiden nicht das PYC2-Gen tragenden Kontrollzelllinien keinen Unterschied auf.

In Tabelle 4.1 wird weiterhin deutlich, dass die Werte der zellspezifischen Glucoseverbrauchs- und Lactatproduktionsraten des Klons CHO DG44/D3 PYC2-B2 im Bereich der metabolischen Raten der PYC2-Klone der Zelllinie BHK-21 A liegen. Die Glutaminverbrauchsrate des Klons PYC2-B2 ist hingegen höher als die gemessenen Glutaminverbrauchsrate der BHK-21 A PYC2-Klone.

Die in der Tabelle aufgeführten Daten verdeutlichen, dass der Unterschied bei der Optimierung der Zelllinien BHK-21 A und CHO DG44/D3 auf die höheren Werte von Glucoseverbrauchs- und Lactatproduktionsrate der BHK-Wildtypzelllinie zurückzuführen ist. Im Gegensatz zu BHK-21 A wird die Zelllinie CHO DG44/D3 in industriellen Produktionsprozessen verwendet (vergleiche 2.1.1.1.1) und ist daher schon weitgehend optimiert.

Tab. 4.1: Vergleich der Zelllinien CHO DG44/D3 und BHK-21 A bezüglich der Verbrauchsraten von Glucose und Glutamin sowie der Produktionsraten von Lactat. Die zellspezifischen Raten sind für die nicht PYC2-exprimierenden, geneticinresistenten Kontrollzelllinien sowie den PYC2-exprimierenden Klon PYC2-B2 der Zelllinie CHO DG44/D3 im Vergleich zu PYC2-Klonen der Zelllinie BHK-21 A dargestellt. Die Daten für die Zelllinie BHK-21 A sind Irani (2000) entnommen.

Metabolische Daten	CHO DG44/D3 pAG-MK (Kontrolle)	BHK-21 A pAG-MK (Kontrolle)	Klon CHO DG44/D3 PYC2-B2	PYC2-Klone BHK-21 A
Zellspezifische Glucoseverbrauchsrate [$\mu\text{mol s}^{-1} 10^{-6}$]	124 ± 18	210	83 ± 3	50...110
Zellspezifische Glutaminverbrauchsrate [$\mu\text{mol s}^{-1} 10^{-6}$]	43 ± 13	48	39 ± 6	21...37
Zellspezifische Lactatproduktionsrate [$\mu\text{mol s}^{-1} 10^{-6}$]	146 ± 16	330	136 ± 8	120...210

Die mit PYC2 transfizierten BHK-Zellen und die PYC2 exprimierende CHO DG44-Zelllinie PYC2-B2 weisen kaum Unterschiede beim Substratverbrauch und bei der Lactatproduktion auf. Daraus kann vermutet werden, dass durch die Klonierung der PYC2 in Säugetierzelllinien der Substratverbrauch und die Lactatproduktion nur bis zu einer bestimmten Grenze verringert werden kann. Die durch die Einführung der PYC2 erreichten minimalen Glucose- und Glutaminverbrauchsraten sowie minimalen Lactatproduktionsraten betrugen $50 \mu\text{mol s}^{-1} 10^{-6}$ bzw. $21 \mu\text{mol s}^{-1} 10^{-6}$ bzw. $120 \mu\text{mol s}^{-1} 10^{-6}$. Diese Werte wurden bei der Optimierung der Zelllinie BHK-21 A erreicht (Irani, 2000).

In kontinuierlichen Säugetierzelllinien wird die Reaktion der Lactat-Dehydrogenase in Richtung Lactatproduktion gedrängt um das in der Glycolyse verbrauchte NAD^+ zu regenerieren (Lanks, 1986). Die von der PYC2 katalysierte Reaktion stellt eine Konkurrenz zur Lactat-Dehydrogenase-Reaktion dar. Allerdings wird durch die PYC2-

Reaktion kein NAD^+ gebildet; dies erfolgt erst in der Malat-Dehydrogenase-Reaktion, die das von der PYC2 gebildete Oxalacetat zu Malat reduziert und in Folge dessen NADH zu NAD^+ oxidiert. Oxalacetat kann jedoch verschiedenen Reaktionen unterliegen. Es ist als Substrat der Aspartat-Aminotransferase eine Vorstufe von Aminosäuren (Stryer, 1990): Aus Oxalacetat wird Aspartat gebildet, aus Aspartat wiederum Asparagin durch die Asparagin-Synthetase. Bei einer nicht ausreichenden Aktivität der cytosolischen Malat-Dehydrogenase würde trotz hoher PYC2-Aktivität kein NAD^+ im Cytosol regeneriert. Dadurch bestände weiterhin die Notwendigkeit der Oxidation des NADH zu NAD^+ .

Die Analyse des Energiemetabolismus der PYC2-exprimierenden Zelllinie CHO DG44/D3 PYC2-B2 ergab reduzierte Glucoseverbrauchsrate im Vergleich zur Kontrolle; Unterschiede zur Kontrolle bezüglich Glutaminverbrauchs- und Lactatproduktionsrate konnten jedoch nicht festgestellt werden. Möglicherweise ist eine geringe Aktivität der cytosolischen Malat-Dehydrogenase in CHO DG44/D3 die Ursache für dieses Phänomen. Die im Vergleich zur Kontrolle unveränderten Lactatproduktionsrate der Zelllinie CHO DG44/D3 PYC2-B2 zeigen, dass bei diesem Klon die Regeneration von NAD^+ durch die Lactat-Dehydrogenase erfolgt. Bei einer verstärkten Bildung von Malat und dessen Einschleusung in den Citratzyklus würde die Notwendigkeit der Bildung von α -Ketoglutarat aus Glutamin reduziert. Bei CHO DG44/D3 PYC2-B2 konnte allerdings keine Verringerung der zellspezifischen Glutaminverbrauchsrate festgestellt werden. Die im Vergleich zur Kontrolle unveränderten Glutaminverbrauchsrate der Zelllinie CHO DG44/D3 PYC2-B2 unterstützen die Hypothese einer nur unzureichenden Aktivität der cytosolischen Malat-Dehydrogenase. Diese Hypothese müsste allerdings durch weitere Experimente überprüft werden.

4.4 Expression der Pyruvat-Carboxylase 2 in der Zelllinie CHO DG44/D3 nach der Transfektion mit dem bicistronischen Vektor pSBC-1/2-HGH/PYC2

Nach der erfolgreichen Expression der Pyruvat-Carboxylase 2 in der Zelllinie CHO DG44/D3 durch Transfektion mit dem monocistronischen Vektor pCMVSHE-PYC2 wurde ein bicistronisches Plasmid konstruiert, das das Gen für das Modellprotein Human Growth Hormone (HGH) und das Gen für die Pyruvat-Carboxylase 2 (PYC2) trägt. Dieses Plasmid wurde als pSBC-1/2-HGH/PYC2 bezeichnet. Durch die Cotransfektion der Zelllinie CHO DG44/D3 mit diesem Plasmid und dem Plasmid pAdD26SV(A)-3, das das Gen für Dihydrofolat-Reductase trägt, ist durch Zugabe von Methotrexat (MTX) zum Kulturmedium die Amplifikation beider Gene möglich.

Als Kontrolle wurde ein zweites Plasmid konstruiert, das ebenfalls das HGH codierende Gen enthält. Das PYC2-Gen wurde in dieses Plasmid jedoch in umgekehrter Orientierung eingebaut, so dass nach der Transfektion mit diesem Plasmid lediglich eine Expression von HGH möglich ist. Dieses Plasmid wurde als pSBC-1/2-HGH/PYC2wd bezeichnet. Beide Plasmide haben die gleiche Größe, daher kann ein Einfluss der Plasmidgröße auf die Transfektionseffizienz ausgeschlossen werden.

Nach der Transfektion der Zelllinie CHO DG44/D3 mit dem Plasmid pSBC-1/2-HGH/PYC2 bzw. pSBC-1/2-HGH/PYC2wd und der anschließenden Selektion erfolgte die Amplifikation der transfizierten Gene durch Zugabe von MTX bis zu einer Konzentration von $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ MTX. Für die folgenden Untersuchungen wurden die resultierenden Mischklonzelllinien herangezogen, da zur Identifikation eines hochproduzierenden Klons die Isolierung und Analyse von mehreren hundert Klonen nötig ist und diese Untersuchungen mehrere Monate andauern würden (Wirth, 1997). Daher werden die Mischklonzelllinien verwendet um eine tendenzielle Aussage treffen zu können.

Die Aktivität der PYC2 in der nach Transfektion und Amplifikation entstandenen Mischklonzelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK konnte mit der in 2.2 beschriebenen und 4.1.2 diskutierten Methode nicht nachgewiesen werden. Die gemessene PYC2-Aktivität war nicht höher als diejenige, die bei der Kontrollzelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd

MK bestimmt wurde.

Die Produktion von HGH konnte jedoch in beiden Zelllinien gezeigt werden (siehe 4.5). Demnach waren die Transfektionen der Zelllinie CHO DG44/D3 erfolgreich. Zur Transfektion wurden die Plasmide in zirkulärer Form verwendet. Wie bereits in 4.1.1 diskutiert wurde, kann sich das Plasmid an unterschiedlichen Stellen öffnen, bevor die Integration in das Wirtschromosom stattfindet (Finn et al., 1989; Koch-Brandt, 1993). Somit besteht die Möglichkeit, dass die Öffnung innerhalb des PYC2-Gens erfolgte und damit die Inaktivierung dieses Gens herbeigeführt wurde. Einige Autoren vermuten in der *in vitro*-Linearisierung des Plasmids vor dem Gentransfer eine erhöhte Effizienz der Integration des Fremdgens (Smithies et al., 1985; Zheng und Wilson, 1990; Spencer, 1991; Wurm, 1997). Durch die *in vitro*-Linearisierung könnte die Spaltung in essentiellen Genbereichen völlig oder zumindest teilweise vermieden werden. Jedoch sind diese Annahmen bislang nicht bewiesen (Koch-Brandt, 1993; Dr. Manfred Wirth, Abteilung Regulation und Differenzierung, GBF, Braunschweig, Deutschland, persönliche Mitteilung; Dr. Charles Hersherberger, Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA, persönliche Mitteilung).

4.5 Produktion von Human Growth Hormone nach Transfektion der Zelllinie CHO DG44/D3 mit dem bicistronischen Plasmid pSBC-1/2-HGH/PYC2

Die Transfektion der Zelllinie CHO DG44/D3 mit den Plasmiden pSBC-1/2-HGH/PYC2 bzw. pSBC-1/2-HGH/PYC2wd war erfolgreich. Die Produktion von Human Growth Hormone (HGH) konnte in den resultierenden Mischklonzelllinien CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK und CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK nachgewiesen werden.

Allerdings zeigten die beiden Zelllinien in Bezug auf die HGH-Produktion erhebliche Unterschiede. Die nicht mit dem PYC2-Gen transfizierte Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK wies in zwei nacheinander durchgeführten Batchkultivierungen drastisch

höhere Produktionsraten auf. In der ersten Batchkultivierung lag die HGH-Produktionsrate der Kontrollzelllinie um den Faktor 3,4 höher als die mit dem PYC2-Gen transfizierte Zelllinie. Im zweiten Kultivierungsexperiment war die HGH-Produktionsrate der mit dem PYC2-Gen transfizierten Zelllinie um den Faktor 1800 geringer als diejenige der Kontrollzelllinie.

Auch die HGH-Konzentrationen in den Kulturüberständen der beiden Zelllinien wiesen beträchtliche Unterschiede auf. Im ersten Kultivierungsexperiment war die HGH-Konzentration im Überstand der Kontrollzelllinie um den Faktor 36 höher als die HGH-Konzentration im Überstand der mit PYC2 transfizierten Zelllinie. In der zweiten Batchkultivierung wies die Kontrollzelllinie sogar eine 6000-fach höhere HGH-Konzentration auf.

Die niedrige HGH-Expression der Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK ist wahrscheinlich darin begründet, dass die Integration der rekombinanten DNA in Bereichen des Chromatins stattgefunden hat, die weniger stark exprimiert werden. Yoshikawa et al. (2000) untersuchten die Produktivität und Stabilität einer rekombinanten CHO-Mischklonzelllinie, die ebenfalls mit Zusatz von Methotrexat selektioniert worden war. Aus den Mischklonen isolierten sie Einzelklone und kamen zu dem Resultat, dass die Produktivität der Zelle stark vom Ort der Integration des rekombinanten Gens im Wirtschromosom abhängt. Klone, die eine verstärkte Produktivität zeigten, enthielten das Fremdgen in der Nähe der Telomerregion eines Chromosoms. Diese Klone wiesen zudem eine größere Stabilität auf als diejenigen Klone, bei denen die Integration des Fremdgens in anderen Bereichen des Chromosoms erfolgte.

Die niedrigere Produktivität der Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK in der zweiten Batchkultivierung im Vergleich zur ersten kann ebenfalls damit erklärt werden, dass bei den meisten Zellen die Integration der Gene für HGH und PYC2 außerhalb der Telomerregion erfolgte und daher die HGH-Produktion nicht stabil war.

Zu ähnlichen Resultaten kamen Kim und Lee (1999), die einen Antikörper in einer DHFR-negativen CHO-Zelllinie klonierten und durch Zugabe von MTX amplifizierten. Durch Analyse der Produktivität von Einzelklonen sowie anschließender Southern Blot-Analyse und Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) erkannten sie, dass hoch-

produzierende Klone die rekombinanten Gene ebenfalls in der Nähe der Telomerregion lokalisiert hatten.

Die Mischklonzelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK ist aus der Cotransfektion der Zelllinie CHO DG44/D3 mit den Plasmiden pSBC-1/2-HGH/PYC2 und pAdD26SV(A)-3 hervorgegangen. Ein weiterer Grund für die geringe Produktivität der Zelllinie kann darin begründet sein, dass die Mehrzahl der Zellen lediglich das DHFR-Gen aufgenommen haben und nicht das bicistronische Plasmid. Solche Zellklone würden bei der Selektion nicht eliminiert. Als Verbesserung wäre daher die Konstruktion eines tricistronischen Vektors denkbar, der neben den Genen für HGH und PYC2 das Gen für DHFR trägt.

Lucas et al. (1996) konstruierten einen bicistronischen Vektor mit den Genen für das Modellprotein und die DHFR. Die Transkription dieser beiden Gene wurde von derselben Transkriptionseinheit kontrolliert. Sie erreichten damit eine größere Anzahl stabil transfizierter und hochexprimierender Klone als durch die Cotransfektion mit den beiden monocistronischen Plasmiden, da nach der Cotransfektion der Marker und das Modellprotein von verschiedenen Transkriptionseinheiten kontrolliert wurden. Die Untersuchungen der Produktivität erfolgten mit den Mischklonen.

Die im Vergleich zur Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK höhere HGH-Produktivität und Stabilität der Kontrollzelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK ist somit wahrscheinlich auf die Integration des HGH-Gens nahe der Telomerregion zurückzuführen. Zur Identifikation eines hochproduzierenden Klons der Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK müsste die Analyse von mehreren hundert Einzelklonen durchgeführt werden. Durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) könnten anschließend die integrierten rekombinanten Gene lokalisiert werden (Trasks und Hamlin, 1989; Dixkens et al., 1998).

4.6 Wachstumsverhalten, Substratverbrauch und Lactatproduktion der Zelllinie CHO DG44/D3 nach der Transfektion mit dem bicistronischen Vektor pSBC-1/2-HGH/PYC2

In den beiden Batchkultivierungen konnte kein Einfluss der PYC2 auf das Wachstumsverhalten der Zelllinie CHO DG44/D3 nach der Transfektion mit dem bicistronischen Plasmid pSBC-1/2-HGH/PYC2 festgestellt werden. Der Verbrauch der Substrate Glucose und Glutamin sowie die Produktion von Lactat waren im Vergleich zur nicht mit PYC2 transfizierten Kontrollzelllinie sogar geringfügig höher.

Nach der Transfektion der Zelllinie CHO DG44/D3 mit dem Plasmid pSBC-1/2-HGH/PYC2 befanden sich die Gene für HGH und PYC2 auf derselben Transkriptionseinheit. Die PYC2-Aktivität der Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK ist daher gekoppelt mit der Produktion von HGH. Mit der in 4.1.2 diskutierten Methode konnte bei der Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK keine höhere PYC2-Aktivität festgestellt werden als bei der Kontrolle. Beide Zelllinien wiesen PYC2-Aktivitäten unterhalb von $2,6 \text{ pkat mg}^{-1}$ auf (vergleiche 3.3.1).

Die geringe PYC2-Aktivität der Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK korreliert mit der schwachen HGH-Produktionsrate, die in den beiden Satzkultivierungen um den Faktor 34 bzw. um den Faktor 1800 geringer war als diejenige der Kontrollzelllinie (siehe 3.3.4.2). Wie bereits oben beschrieben kommt als Ursache dafür die Integration der beiden Gene in Bereichen des Chromatins in Betracht, die nur schwach exprimiert werden (Kim und Lee, 1999; Yoshikawa et al., 2000).

4.7 Nukleotidpools der Zelllinien CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK und CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK

Nukleotide üben im Zellmetabolismus wichtige Funktionen aus. Sie sind von Bedeutung als aktivierte Vorstufen bei der Nukleinsäuresynthese sowie als Regulatoren vieler Stoffwechselwege (Wylegalla et al., 1985). Veränderungen des Nukleotidpools ermöglichen Rückschlüsse auf den physiologischen Zustand der Zelle (Wylegalla et al., 1985; Ryll und Wagner, 1992).

Die Nukleotidpools der mit dem PYC2-Gen transfizierten Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK und der Kontrollzelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK sollten ermittelt und miteinander verglichen werden. Durch die Bestimmung der NTP-, U- und NTP/U-Werte sollte das Wachstumsverhalten der beiden Zelllinien analysiert werden.

Die universelle Form der zellulären Energie stellt ATP dar (Atkinson, 1977). Daher sollten die Pools der energiereichen Nukleotide ATP und GTP der Zelllinien CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK und CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK bestimmt und verglichen werden.

Außerdem sollte die intrazellulären UDPGNac-Konzentrationen dieser beiden Zelllinien ermittelt werden.

Die Resultate der Nukleotidanalyse der Zelllinien CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK und CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK sollten zudem mit den von Irani (2000) ermittelten Nukleotidpools der mit dem PYC2-Gen transfizierten Zelllinie BHK-21 A verglichen werden.

4.7.1 NTP-Wert

Der NTP-Wert stellt den Quotienten aus Purin- und Pyrimidintriphosphaten dar (siehe Gleichung 2.5.4). Er wurde bestimmt um das Wachstumsverhalten der Zelllinien CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK und CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK miteinander zu vergleichen und zu ermitteln, ob durch die Klonierung der PYC2 in die Zelllinie CHO DG44/D3 eine Prolongation der exponentiellen Wachstumsphase möglich war.

Dieser Wert spiegelt den physiologischen Zustand einer Zelle wider (Ryll, 1992; Ryll und Wagner, 1992). Der zeitliche Verlauf des NTP-Werts ermöglicht eine präzise Abgrenzung der zellulären Wachstumsphasen (Ryll und Wagner, 1992).

Während der Adaptationsphase sinkt der NTP-Wert und bleibt in der exponentiellen Wachstumsphase nahezu konstant. Zu Beginn der Phase reduzierten exponentiellen Wachstums steigt der NTP-Wert drastisch an (Ryll und Wagner, 1992). Die Abgrenzung dieser Phase wäre ausschließlich durch Zellzählung sehr ungenau. In der stationären Wachstumsphase und der Absterbephase sinkt der NTP-Wert als Folge eines verringerten Purinnukleotidpools.

Im Verlauf der beiden Batchkultivierungen der Zelllinien CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK und CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK war kein Unterschied bezüglich des zeitlichen Verlaufes des NTP-Werts zu erkennen (siehe 3.3.4.1). Eine Prolongation der exponentiellen Wachstumsphase in der Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK konnte anhand des zeitlichen Verlaufs des NTP-Werts nicht festgestellt werden.

4.7.2 U-Wert

Der U-Wert stellt den Quotienten aus UTP und UDPGNAC dar (siehe Gleichung 2.5.5). Er wurde ermittelt, um das Wachstumsverhalten der Zelllinien CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK und CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK miteinander zu vergleichen.

Dieser Wert verhält sich gegenläufig zum NTP-Wert (Ryll und Wagner, 1992). In der Adaptationsphase steigt der U-Wert und bleibt in der exponentiellen Wachstumsphase nahezu konstant. Zu Beginn der Phase reduzierten exponentiellen Wachstums sinkt der U-Wert deutlich (Ryll und Wagner, 1992). Dies ist auf den Anstieg des UDPGNAC-Pools während dieser Phase zurückzuführen.

In den beiden Batchkultivierungen der Zelllinien CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK und CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK waren keine Unterschiede bezüglich des zeitlichen Verlaufes des U-Werts zu erkennen.

Irani (2000) ermittelte die U-Werte der mit PYC2 transfizierten Zelllinie BHK-21 A und stellte im Vergleich zum nicht transfizierten Wildtyp niedrigere U-Werte fest. Die

niedrigeren U-Werte waren auf den höheren UDPGNac-Pool der PYC2-exprimierenden BHK-Zelllinie bei gleichem UTP-Pool zurückzuführen.

4.7.3 NTP/U-Wert

Der NTP/U-Wert gibt den Quotienten aus NTP-Wert und U-Wert wieder. Durch die Verknüpfung von NTP-Wert und U-Wert stellt der NTP/U-Wert einen verlässlichen Parameter zur Beurteilung des Wachstumszustands von Zellen dar (Ryll und Wagner, 1992). Sein zeitlicher Verlauf ist demjenigen des NTP-Werts ähnlich (siehe 4.7.1). Unterschiede im Wachstumsverhalten der beiden Zelllinien CHO DG44/D3 HGH/PYC2 MK und CHO DG44/D3 HGH/PYC2wd MK sind aus dem zeitlichen Verlauf des NTP/U-Werts nicht zu erkennen (siehe 3.3.4.1). Einziger Unterschied ist der vergleichsweise hohe NTP/U-Wert von 5,3, den die Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK zu Beginn des zweiten Kultivierungsexperiments aufweist. Dieser hohe NTP/U-Wert zeigt an, dass sich diese Zelllinie in der Adaptationsphase befindet (Ryll und Wagner, 1992).

4.7.4 Zellulärer ATP- und GTP-Gehalt

Der zelluläre Gehalt an ATP und dem energetisch äquivalenten GTP spiegelt das Energieniveau einer Zelle wider (Atkinson, 1977).

Die Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK wies gegenüber der Kontrollzelllinie, die nicht mit dem PYC2-Gen transfiziert worden war, in beiden Kultivierungsexperimenten keine Unterschiede bezüglich des zellspezifischen Gehalts von ATP und GTP auf. Dieses Ergebnis korreliert mit den Aktivitätsbestimmungen der PYC2 (siehe 4.4): Da in beiden Experimenten keine Aktivität der PYC2 in der Zelllinie CHO DG44/ D3 HGH-PYC2 MK nachgewiesen werden konnte, ergaben sich ebenfalls keine Unterschiede zur Kontrollzelllinie bezüglich der Pools der energiereichen Nukleotide ATP und GTP. Irani (2000) analysierte den ATP- und GTP-Gehalt einer PYC2-exprimierenden BHK-21 A-Zelllinie. Sie stellte fest, dass der ATP-Pool um den Faktor 1,4 erhöht worden war, der GTP-Pool um den Faktor 1,3.

Einige Autoren konnten eine höhere Produktivität der Zelle bei erhöhtem ATP-Gehalt feststellen (Pendse und Bailey, 1994; Neermann, 1996). Neermann (1996) zeigte, dass die Produktion des Modellproteins β -Galactosidase bei einem dreifach erhöhten ATP-Pool ebenfalls um den Faktor 3 erhöht werden konnte.

Jackson (1991) erklärte den Einfluss erhöhter ATP-Konzentration auf die Produktivität mit einem Zusammenhang zwischen der ATP-Menge und der Translationseffizienz von mRNA, wobei ATP zur Auflösung von Sekundärstrukturen der mRNA benötigt wird.

ATP ist zudem bei der Herstellung von Aminoacyl-tRNA-Molekülen für die Translation erforderlich (Stryer, 1990) und trägt auch dadurch zur Produktivität bei.

4.7.5 Zellulärer UDPGNac-Gehalt

Ein erhöhter zellulärer UDPGNac-Gehalt beeinflusst das Glycosylierungsmuster vieler Zellproteine (Goochee und Monica, 1990; Pels Rijcken et al., 1995; Gawlitzek et al., 1998; Grammatikos et al., 1998; Cayli et al., 1999; Valley et al., 1999). UDPGNac entsteht in der Zelle aus Ammonium und Fructose-6-phosphat; diese Reaktion wird durch die Glucosamin-6-phosphat-Isomerase katalysiert (Ryll et al., 1994; Valley et al., 1999).

Cayli et al. (1999) gelangen eine Verringerung des intrazellulären UDPGNac-Gehalts durch Zugabe von Mannose zum Kulturmedium. Nach Aufnahme in die Zelle wird Mannose von der Hexokinase zu Mannose-6-phosphat phosphoryliert. Dieses ist ein starker Inhibitor der Glucosamin-6-phosphat-Isomerase (Cayli et al., 1999).

Die Zelllinien CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK und CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK wiesen keine Unterschiede bezüglich des zellulären UDPGNac-Gehalts auf.

Irani (2000) verglich den zellulären UDPGNac-Gehalt einer PYC2-exprimierenden BHK-21 A-Zelllinie mit demjenigen der BHK-Wildtypzelllinie in kontinuierlicher Kultivierung und konnte zeigen, dass der UDPGNac-Gehalt der PYC2-exprimierenden Zelllinie um den Faktor 1,48 höher ist als bei der Wildtypzelllinie. Als Ursache für den erhöhten UDPGNac-Pool vermutete Irani (2000) die Regulation der Phosphofructokinase durch ATP, was zu einem Anstieg des intrazellulären Fructose-6-phosphat-

Gehalts führen würde. Fructose-6-phosphat ist eine Vorstufe bei der Biosynthese von UDPGNac (siehe oben).

Die Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK wies im Vergleich zur Kontrolle keinen erhöhten ATP-Gehalt auf. Eine Verringerung der Phosphofructokinase-Aktivität durch einen erhöhten ATP-Pool kann bei dieser Zelllinie demnach weitgehend ausgeschlossen werden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die kontinuierliche Säugetierzelllinie CHO DG44 gilt als die derzeit wichtigste Produktionszelllinie von komplexen, pharmazeutisch nutzbaren Proteinen. Mit dieser Zelllinie ist die Amplifikation von rekombinanten Genen möglich und dadurch kann eine höhere Produktivität als mit anderen kontinuierlichen Säugetierzelllinien erreicht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Expression der cytosolischen Pyruvat-Carboxylase 2 aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* auf den primären Energiemetabolismus und die Produktivität der Zelllinie CHO DG44/D3 untersucht.

Die Einführung des PYC2-codierenden Gens in die Zelllinie CHO DG44/D3 wurde zunächst als Cotransfektion mit dem monocistronischen Vektor pCMVSHE-PYC2 und dem Vektor pAG60 durchgeführt. pAG60 trägt das Resistenzgen gegen das Antibiotikum Geneticin (G418). Die Expression der PYC2 konnte in dem Einzelklon CHO DG44/D3 PYC2-B2 durch mRNA-Analyse und Enzymaktivitätsbestimmung nachgewiesen werden. In zwei Satzkultivierungen wurden das Wachstum und der Energiemetabolismus der mit PYC2 transfizierten Zellen und der nicht mit dem PYC2-Gen transfizierten Kontrollzelllinie miteinander verglichen. Unterschiede zwischen der PYC2-exprimierenden Zelllinie CHO DG44/D3 PYC2-B2 und der Kontrolle wurden im Zellwachstum festgestellt: Die Zelllinie CHO DG44/D3 PYC2-B2 erreichte eine 1,5-fach höhere maximale Zellkonzentration, ihre Wachstumsrate war ebenfalls 1,5-fach höher als diejenige der Kontrolle.

Bei der Analyse der Verbrauchsraten der energieliefernden Substrate Glucose und Glutamin konnte lediglich eine Reduktion des Glucoseverbrauchs gezeigt werden. Die zellspezifischen Glucoseverbrauchsraten von CHO DG44/D3 PYC2-B2 waren im Durchschnitt um den Faktor 1,5 geringer als diejenigen der Kontrolle. Unterschiede bezüglich des Glutaminverbrauchs waren nicht zu erkennen. Auch der Vergleich der zellspezifischen Lactatproduktionsraten von CHO DG44/D3 PYC2-B2 und der nicht mit dem PYC2-Gen transfizierten Kontrollzelllinie ergab keine Unterschiede zwischen diesen beiden Zelllinien.

Die Transfektion der Zelllinie BHK-21 A mit PYC2 (Irani et al., 1999; Irani, 2000) resultierte hingegen in einer Verringerung der Substratverbrauchsraten von Glucose und Glutamin um den Faktor 4 bzw. um den Faktor 2,3 sowie in einer 2,4-fachen Verminderung der Lactatproduktion. Allerdings wies die BHK-Wildtypzelllinie doppelt so hohe Glucoseverbrauchs- und Lactatproduktionsraten auf wie die Wildtypzelllinie CHO DG44/D3, und die metabolischen Raten des PYC2-exprimierenden Klons CHO DG44/D3 PYC2-B2 lagen im Bereich der metabolischen Raten, die bei PYC2-exprimierenden BHK-21 A-Klonen bestimmt worden waren (Irani, 2000). Aus diesem Vergleich kann geschlossen werden, dass der Energiestoffwechsel der Zelllinie CHO DG44/D3 im Rahmen der Möglichkeiten kontinuierlicher Zelllinien bereits weitgehend optimiert ist.

Nach der erfolgreichen Expression der Pyruvat-Carboxylase 2 in der Zelllinie CHO DG44/D3 durch Transfektion mit dem monocistronischen Vektor pCMVSHE-PYC2 wurde ein bicistronisches Plasmid konstruiert, das die Gene für das Modellprotein Human Growth Hormone (HGH) und das Gen für die Pyruvat-Carboxylase 2 (PYC2) enthält. Dieses Plasmid wurde als pSBC-1/2-HGH/PYC2 bezeichnet. Durch die Cotransfektion der Zelllinie CHO DG44/D3 mit diesem Plasmid und dem Plasmid pAdD26SV(A)-3, das das Gen für Dihydrofolat-Reductase trägt, ist durch Zugabe von Methotrexat (MTX) zum Kulturmedium sowohl die Amplifikation des HGH-Gens als auch die Amplifikation des PYC2-Gens möglich. Zudem wurde ein zweites Plasmid konstruiert, das ebenfalls das HGH-codierende Gen trägt; das PYC2-Gen wurde in dieses Plasmid jedoch in umgekehrter Orientierung eingefügt, so dass nach der Transfektion mit diesem Plasmid lediglich eine Expression von HGH erfolgen kann. Dieses Plasmid wurde als pSBC-1/2-HGH/PYC2wd bezeichnet und diente als Kontrolle. Beide Plasmide waren gleich groß, daher konnte ein Einfluss der Plasmidgröße auf die Transfektionseffizienz ausgeschlossen werden.

Die Amplifikation der rekombinanten Gene erfolgte durch Zugabe von Methotrexat bis zu einer Konzentration von $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ MTX. Für die Analyse des Energiemetabolismus und der Produktivität wurden die Mischklonzelllinien herangezogen, die als CHO

DG44/D3 HGH-PYC2 MK (PYC2-Gen in richtiger Orientierung) und CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK (PYC2-Gen in umgekehrter Orientierung) bezeichnet wurden.

Die Produktion des Modellproteins Human Growth Hormone konnte in beiden Zelllinien nachgewiesen werden. Allerdings ergaben sich in zwei nacheinander durchgeführten Satzkultivierungen sehr große Unterschiede bezüglich der Produktivität. Die HGH-Produktionsrate der mit dem PYC2-Gen transfizierten Zelllinie war in der ersten Satzkultur um den Faktor 3,4 geringer als diejenige der Kontrollzelllinie mit dem PYC2-Gen in umgekehrter Orientierung, in der zweiten Satzkultur sogar um den Faktor 1800. Dementsprechend war die HGH-Konzentration im Kulturüberstand der Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK in der ersten Satzkultur um den Faktor 36 niedriger als bei der Kontrolle, in der zweiten Satzkultur um den Faktor 6000.

Diese Ergebnisse zeigen einen drastischen Unterschied zwischen den beiden Zelllinien CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK und CHO DG44/D3 HGH-PYC2wd MK. Die HGH-Expression der Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK war nicht stabil. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Integration des HGH-codierenden Gens in Bereiche des Wirtschromatins erfolgte, die nur schwach exprimiert wurden.

In der mit dem PYC2-Gen in richtiger Orientierung transfizierten Zelllinie CHO DG44/D3 HGH-PYC2 MK konnte keine Aktivität der PYC2 nachgewiesen werden.

Beide Zelllinien wiesen keine Unterschiede bezüglich der Verbrauchsraten der energieliefernden Substrate Glucose und Glutamin auf; auch die Lactatproduktionsraten und die intrazellulären Nukleotidpools der beiden Zelllinien zeigten keine Unterschiede.

Diese Resultate sind aus einer einzigen Transfektion der Zelllinie CHO DG44/D3 mit dem bicistronischen Plasmid pSBC-1/2-HGH/PYC2 erzielt worden. Die gemeinsame Amplifikation des Modellproteins und der PYC2 konnte mit dieser Transfektion nicht realisiert werden. Daher wäre in weiterführenden Experimenten die Optimierung der Transfektion von CHO DG44 mit diesem bicistronischen Plasmid erforderlich. Eine sehr erfolgversprechende Strategie zur Verbesserung der Genexpression in CHO-Zellen stellt die zielgerichtete Integration (*site-specific integration*) dar. Durch das

gezielte Einbringen von rekombinanten Genen in Bereiche hoher Transkriptionsaktivität kann zum einen die Genexpression verbessert werden, zum anderen ist eine gute Reproduzierbarkeit der Transfektion gewährleistet.

Als weitere Strategie zur Verbesserung des Energiemetabolismus in der Zelllinie CHO DG44 wäre die gekoppelte Expression rekombinanter Hexokinase und PYC2 denkbar. Durch den erhöhten glycolytischen Flux und die Einschleusung des Glucosekohlenstoffs in den Citratzyklus könnte ein deutlicher Anstieg des zellulären ATP-Gehalts herbeigeführt und als Folge dessen eine höhere Produktivität der Zellen erreicht werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Ahmad, F., Ahmad, P. M., Mendez, A. 1986. Rat liver pyruvate carboxylase. Purification, detection and quantification of apo and holo forms by immunoblotting and by an enzyme linked immunosorbent assay. *Biochem. J.* 236, 527-533
2. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. 1990. *Molekularbiologie der Zelle*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
3. Atkin, M. B., Utter, F. M., Weinberg, B. M. 1979. Pyruvate carboxylase and phosphoenol pyruvate carboxykinase activity in leukocytes and fibroblasts from a patient with pyruvate carboxylase deficiency. *Pediat. Res.* 13, 38-43
4. Atkinson, D. E. 1977. In: *Cellular energy metabolism and its regulation*. Academic Press, New York
5. Bailey, J. E. 1991. Towards a Science of Metabolic Engineering. *Science* 252, 1668-1675
6. Bedard, C., Tom, R., Kamen, A. 1993. Growth, Nutrient Consumption, and End Product Accumulation in Sf-9 and BTI-EAA Insect Cell Cultures: Insights into Growth Limitation and Metabolism. *Biotechnol. Prog.* 9, 615-624
7. Bell, S. L., Bebbington, C., Scott, M. F., Wardell, J. N., Spier, R. E., Bushell, M. E., Sanders, P. G. 1995. Genetic Engineering of Hybridoma Glutamine Metabolism. *Enzyme and Microbial Technology* 17, 98-106
8. Bertheussen, K. 1993. Growth of cells in a new defined protein-free medium. *Cytotechnology* 11, 219-231

-
9. Blanche , F., Guillaume, J. M. 1998. Recombinant adenovirus production in packaging cells with recovery from supernatant. Patent-Nr. WO 9800524
 10. Boxer, G. E., Devlin, T. M. 1961. Pathways of intracellular hydrogen transport. Absence of enzymatic hydrogen-carrying systems is a factor in aerobic glycolysis of malignant tissue. *Science* 134 (3489), 1495-1501
 11. Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
 12. Brewster, N. K., Val, D. L., Walker, M. E., Wallace, J. C. 1994. Regulation of Pyruvate Carboxylase Isozyme (PYC1, PYC2) gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentative and nonfermentative growth. *Arch. Biochem. Biophys.* 311(1), 62-71
 13. Camargo, M., Cervenka, J. 1980. Pattern of chromosomal replication in synchronized lymphocytes. Evaluation and amplification of methotrexate block. *Human Genetics* 54, 47-53
 14. Cameron, D. C., Tong, I.-T. 1993. Cellular Metabolic Engineering. An Overview. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 38, 105-139
 15. Capon, D., Chamow, S. M., Mordenti, J., Marsters, S. A., Gregory, T., Mitsuya, H., Byrn, R. A., Lucas, C., Wurm, F. M., Groopman, J. F., Broder, S., Smith, D. H. 1989. Designing CD4 immonoadhesins for AIDS therapy. *Nature* 337, 525-531
 16. Cayli, A., Hirschmann, F., Wirth, M., Hauser, H., Wagner, R. 1999. Cell Lines With Reduced UDP-N-Acetylhexosamine Pool in the Presence of Ammonium.

- Biotech. Bioeng. 65, 192-200
17. Cazzulo, J. J., Stoppani, A. O. M. 1967. Purification and properties of pyruvate carboxylase from Baker's Yeast. Arch. Biochem. Biophys. 121, 596-608
 18. Chang, Y.-H. D., Grodzinsky, A. J., Wang, D. I. C. 1995a. In-Situ Removal of Ammonium and Lactate through Electrical Means for Hybridoma Cultures. Biotech. Bioeng. 47, 308-317
 19. Chang, Y.-H. D., Grodzinsky, A. J., Wang, D. I. C. 1995b. Nutrient Enrichment and In-Situ Waste Removal through Electrical Means for Hybridoma Cultures. Biotech. Bioeng. 47, 319-326
 20. Cherlet, M., Marc, A. 1998. Intracellular pH monitoring as a tool for the study of hybridoma cell behavior in batch and continuous bioreactor cultures. Biotechnol. Prog. 14, 626-638
 21. Chmiel, H. 1991a. Bioprozesstechnik 1. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
 22. Chmiel, H. 1991b. Bioprozesstechnik 2. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
 23. Clark, A. J., Bessos, H., Bishop, J. O., Brown, P., Harris, S., Lathe, R., McClenaghan, M., Prowse, C., Simons, J. P., Whitelaw, C. B. A., Wilmut, I. 1989. Expression of human anti-hemophilic factor IX in the milk of transgenic sheep. Bio/Technology 7, 487-492
 24. Colbere-Garapin, F., Ryhiner, M. L., Stephany, I., Kourilsky, P., Garapin, A. C. 1986. Patterns of integration of exogenous DNA sequences transfected into mammalian cells of primate and rodent origin. Gene 50, 279-289

-
25. Conradt, H. S., Ausmeier, M., Dittmar, K. E. J., Hauser, H., Lindenmaier, W. 1989. Secretion of glycosylated human interleukin-2 by recombinant mammalian cell lines. *Carbohydr. Res.* 149, 443-450
 26. Cooper, J. D. H., Lewis, M. T., Turnell, D. C. 1984a. Pre-column ortho-Phthaldialdehyd Derivatization of Amino Acids and their Separation Using Reversed-Phase HPLC: I. Detection of the Amino Acids Hydroxyproline and Proline. *J. Chromatogr.* 285, 484-489
 27. Cooper, J. D. H., Lewis, M. T., Turnell, D. C. 1984b. Pre-column ortho-Phthaldialdehyd Derivatization of Amino Acids and their Separation Using Reversed-Phase HPLC: II. Simultaneous Determination of Amino and Imino Acids in Protein Hydrolysates. *J. Chromatogr.* 285, 490-494
 28. Denoto, F. M., Moore, D. D., Goodman, H. M. 1981. Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* 9, 3719-3730
 29. Devaux, B., Lefrancois, D., Crepin, M. 1985. Transcription of integrated MMTV LTR DNA in fibroblast clones is not associated with DNA methylation but with the integration site. *Biochimie* 67 (7-8), 853-860
 30. Dietzen, J. D., Davis, J. E. 1993. Oxidation of pyruvate, malate, citrate and cytosolic reducing equivalents by AS-30D Hepatoma mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 305 (1), 91-102
 31. Dirks, W., Wirth, M., Hauser, H. 1993. Dicistronic transcription units for gene expression in mammalian cells. *Gene* 128, 247-249
 32. Dixkens, C., Posseckert, G., Keller, T., Hameister, H. 1998. Structural analysis

- of the amplified IFN- β and DHFR genes in a Chinese hamster ovary cell line using multicolour FISH analysis. *Chromosome Research* 6, 329-332
33. Donnelly, M., Scheffler, I. E. 1976. Energy Metabolism in Respiration-deficient and Wild Type Chinese Hamster Fibroblasts in Culture. *J. Cell. Physiol.* 89, 39-52
34. Doyle, C., Butler, M. 1990. The effect of pH on the toxicity of ammonia to a murine hybridoma. *J. Biotechnol.* 15, 91-100
35. Eagle, H. 1959. Minimum essential medium. *Science* 130, 432
36. Felgner, P. L., Ringold, G. M. 1987. Cationic liposome-mediated transfection. *Nature* 337, 387-388
37. Fiechter, A., Gmünder, F. K. 1989. Metabolic Control of Glucose Degradation in Yeast and Tumor Cells. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 39,1-28
38. Finn, G. K., Kurz, B. W., Cheng, R. Z., Shmookler, R. J. 1989. Homologous plasmid recombination is elevated in immortally transformed cells. *Mol. Cell. Biol.* 9, 4009-4017
39. Fitzpatrick, L., Jenkins, H. A., Butler, M. 1993. Glucose and glutamine metabolism of a murine B-Lymphocyte hybridoma grown in batch culture. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 43, 93-116
40. Flintoff, W. F., Davidson, S. V., Siminovitch, L. 1976. Isolation and partial characterization of three methotrexate-resistant phenotypes from Chinese hamster ovary cells. *Somatic Cell Genet.* 2(3), 245-261

-
41. Flintoff, W. F., Weber, M. K., Nagainis, C. R., Essani, A. K., Robertson, D. Salser, W. 1982. Overproduction of dihydrofolate reductase and gene amplification in methotrexate-resistant Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell Biol.* 2(3), 275-285
 42. Fürst, P., Pollack, L., Graser, T. A., Godel, H., Stehle, P. 1990. Appraisal of four pre-column derivatization methods for HPLC determination of free amino acids in biological materials. *J. Chromatogr.* 449, 557-569
 43. Ganguly, S., Sharp, A. P., RajBhandary, U. L. 1988. *Saccharomyces cerevisiae* SUP53 tRNA gene transcripts are processed by mammalian cell extracts in vitro but are not processed in vivo. *Mol. Cel. Biol.* 8 (1), 361-370
 44. Gassen, H. G., Martin, A., Bertram, S. 1991. *Gentechnik*. Gustav Fischer Verlag Stuttgart
 45. Gawlitzek, M., Nimtz, M., Wagner, R., Valley, U., Conradt, H. S. 1998. Ammonium ion and glucosamine dependent increase of oligosaccharide complexity in recombinant glycoproteins secreted from cultivated BHK-21 cells. *Biotech. Bioeng.* 57 (5); 518-528
 46. Glacken, M. W., Fleischaker, R. J., Sinskey, A.J. 1986. Reduction of Waste Product Excretion via Nutrient Control: Possible Strategies for Maximizing Product and Cell Yields on Serum in Cultures of Mammalian Cells. *Biotech. Bioeng.* 28, 1376-1389
 47. Glacken, M. W. 1988. Catabolic Control of Mammalian Cell Culture. *Bio/Technology* 6, 1041-1050
 48. Goeddel, D. V., Kohr, W. J., Pennica, D., Vohar, G. A. 1983. Human tissue

- plasminogen activator, pharmaceutical compositions containing it, processes for making it, and DNA and transformed intermediates thereof. United Kingdom Patent 2, 119,804.
49. Goergen, L. J., Marc, A., Engasser, M. J. 1994. Influence of lactate and ammonia on the death rate of hybridoma. In: Spier, E. R., Griffiths, B. J., Berthold, W. (eds.), Animal cell technology. Butterworth Heinemann Verlag Oxford
 50. Golf, S. P., Berg, P. 1979. Construction, propagation and expression of Simian Virus 40 recombinant genomes containing the *Escherichia coli* gene for thymidine kinase and a *Saccharomyces cerevisiae* gene for tyrosine transfer RNA. J. Mol. Biol. 133, 359-383
 51. Goochee, C. F., Monica, T. 1990. Environmental effects on protein glycosylation. Bio/Technology 8, 421-427
 52. Goochee, C. F., Gramer, M. J., Andersen, D. C., Bahr, J. B., Rasmussen, J. R. 1991. The Oligosaccharides of Glycoproteins: Bioprocess Factors Affecting Oligosaccharide Structure and Their Effect on Glycoprotein Properties. Bio/Technology 9, 1347-1355
 53. Goss, N. H., Dyer, P. Y., Keech, D. B., Wallace, J. C. 1979. An electron microscopic study of pyruvate carboxylase. J. Biol. Chem. 254 (5), 1734-1739
 54. Graf, L. H., Chasin, L. A. 1982. Gamma Rays Induce Gross Alterations in the DNA sequence of the Dihydrofolate Reductase Gene. Mol. Cell. Biol. 2, 93-96
 55. Graham, F. L., van der Eb, A. J. 1973. A new technique for the assay of infective human adenovirus 5 DNA. Virology 52, 456-467

-
56. Grammatikos, S. I., Valley, U., Nimtz, M., Conradt, H. S., Wagner, R. 1998. Intracellular UDP-N-Acetylhexosamine pool affects N-glycan complexity: A mechanism of ammonium action on protein glycosylation. *Biotechnol. Prog.* 14, 410-419
 57. Greenhouse, V. W. V., Lehninger, L. A. 1976. Occurrence of the malate-aspartate shuttle in various tumor types. *Cancer Res.* 36, 1392-1396
 58. Griffiths, J. B. 1987. Serum and growth factors in cell culture media - an introductory review. *Dev. Biol. Stand.* 66, 155-160
 59. Häggström, L. 1991. Energetics of glutaminolysis - a theoretical evaluation. *Production of Biologicals from Animal Cells in Culture. ESACT 10th Meeting*, 79-81. Butterworth-Heinemann Verlag, Oxford
 60. Häggström, L., Ljunggren, J., Öhman, L. 1996. Metabolic engineering of animal cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 782, 40-52
 61. Handa-Corrigan, A., Nikolay, J., Jeffery, D., Heffernan, B., Young, A. 1992. Controlling and predicting monoclonal antibody production in hollow-fiber bioreactors. *Enzyme Microb. Technol.* 14 (1), 58-63
 62. Hauser, H. 1997. Heterologous Expression of Genes in Mammalian Cells. In: Hauser, H., Wagner R. (eds.), *Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production*, 3-32. Walter de Gruyter Verlag Berlin
 63. Hellenbroich, D. 1995. Einsatz von Airlift-Reaktoren für Produktionsverfahren mit tierischen Zellkulturen. Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

-
64. Houdebine, L. M. 1994. Production of pharmaceutical proteins from transgenic animals. *J. Biotechnol.* 34, 269-287
 65. Ingram, L. O., Conway, T., Clark, D. P., Sewell, G. W., Preston, J. F. 1987. Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2420-2425
 66. Irani, N., Wirth, M., van den Heuvel, J., Wagner, R. 1999. Improvement of the primary metabolism of cell cultures by introducing a new cytoplasmic pyruvate carboxylase reaction. *Biotech. Bioeng.* 66 (4): 238-246
 67. Irani, N. 2000. Verbesserung des Energiestoffwechsels von kontinuierlichen Zelllinien durch die Einführung einer Hefe-Pyruvat-Carboxylase. Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
 68. Irani, N., Beccaria, A. J., Wagner, R. 2002. Expression of recombinant cytoplasmic yeast pyruvate carboxylase for the improvement of the production of human erythropoietin by recombinant BHK-21 cells. *Biotech. Bioeng.* 93, 269-282
 69. Jackson, R. J. 1991. The ATP requirement for initiation of eukaryotic translation varies according to the mRNA species. *Eur. J. Biochem.* 200, 285-294
 70. Jenkins, N., Curling, E. M. A. 1994. Glycosylation of recombinant proteins: Problems and prospects. *Enzyme Microb. Technol.* 16, 354-364
 71. Kao, F.-T., Puck, T. T. 1968. Genetics of somatic mammalian cells VII. Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 60, 1275-1281

-
72. Karlson, P. 1988. Biochemie. 13. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
 73. Kaufman, R. J., Sharp, P. 1982. Amplification and Expression of Sequences Cotransfected with a Modular Dihydrofolate Reductase Complementary DNA Gene. *J. Mol. Biol.* 159, 601-621
 74. Kaufman, R. J., Wasley, L. C., Spiliotes, A. J., Gosseis, S. D., Latt, S. A., Larsen, G. R., Kay, R. M. 1985. Coamplification and coexpression of human tissue-type plasminogen activator and murine dihydrofolate reductase in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell. Biol.* 5, 1750-1759
 75. Kaufman, R. J. 1990. Selection and coamplification of heterologous genes in mammalian cells. *Methods Enzymol.* 185, 537-566
 76. Kaufmann, H., Mazur, X., Fussenegger, M., Bailey, J. E. 1999. Influence of Low Temperature on Productivity, Proteome and Protein Phosphorylation of CHO Cells. *Biotech. Bioeng.* 63 (5), 573-582
 77. Keech, D. B., Utter, M. F. 1963. Pyruvate Carboxylase. II. Properties. *J. Biol. Chem.* 238 (8), 2609-2614
 78. Kehr, D., Maass, K., Bode, J. 1991. Scaffold-attached regions from the human interferon beta domain can be used to enhance the stable expression of genes under the control of various promoters. *Biochemistry* 30, 1264-1270
 79. Kim, E. J., Kim, N. S., Lee, G. M. 1998. Development of a serum-free medium for dihydrofolate reductase-deficient Chinese hamster ovary cells (DG44) using a statistical design: beneficial effect of weaning of cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 35 (4), 178-182

-
80. Kim, S. J., Lee, G. M. 1999. Cytogenic analysis of chimeric antibody-producing CHO cells in the course of dihydrofolate reductase-mediated gene amplification and their stability in the absence of selective pressure. *Biotechnol. Bioeng.* 64 (6), 741-749
 81. Koch-Brandt, C. 1993. *Gentransfer: Prinzipien - Experimente - Anwendung bei Säugern.* Georg-Thieme Verlag, Stuttgart, New York
 82. Köhler, G., Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497
 83. Kratje, R. B., Lincoln, D. 1992. *Calculation of Cell Culture Parameters. Kalkulationsprogramm, geschrieben in C, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig, Deutschland*
 84. Krimpenfort, P., Rademakers, A., Eyestone, W., van der Schans, A., van den Broek, Kooiman, P., Kootwijk, E., Platenburg, G., Pieper, F., Strijer, R., de Boer, H. 1991. Generation of transgenic dairy cattle using in vitro embryo production. *Bio/Technology* 9, 844-847
 85. Ko, Y. F., Bentley, W. E., Weigand, W. A. 1995. The effect of cellular energetics on foreign protein production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 50, 145-159
 86. Kovacevic, Z. 1972. Possibility for the transfer of reducing equivalents from the cytosol to the mitochondrial compartment in Ehrlich ascites tumor cells by the malate-aspartate shuttle. *Eur. J. Biochem.* 25, 372-378
 87. Krebs, H. A. 1970. The history of the tricarboxylic acid cycle. *Perspect. Biol. Med.* 14, 154-170

-
88. Kulka, R. G., Cohen, H. 1973. Regulation of Glutamine Synthetase Activity of Hepatoma Tissue Culture Cells By Glutamine and Dexamethasone. *J. Biol. Chem.* 248 (19), 6738-6743
 89. Kurokawa, H., Park, Y. S., Iljima, S., Kobayashi, T. 1994. Growth Characteristics in Fed-Batch Culture of Hybridoma Cells with Control of Glucose and Glutamine Concentrations. *Biotech. Bioeng.* 44, 95-103
 90. Lanks, K. W. 1986. Glutamine Is Responsible for Stimulating Glycolysis by L929 Cells. *J. Cell. Physiol.* 126, 319-321
 91. Lanks, K. W. 1987. End Products of Glucose and Glutamine Metabolism by L929 Cells. *J. Biol. Chem.* 262, 10093-10097
 92. Lanks, K. W., Li, P. W. 1988. End Products of Glucose and Glutamine Metabolism by Cultured Cell Lines. *J. Cell. Physiol.* 135, 151-155
 93. Lao, M. S., Toth, D. 1997. Effects of ammonium and lactate on growth and metabolism of a recombinant Chinese Hamster Ovary cell culture. *Biotechnol. Prog.* 13, 688-691
 94. Larsen, B. R., West, F. G. 1981. A method for quantitative amino acid analysis using precolumn o-phthaldialdehyde derivatization and high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* 19, 259-265
 95. Leader, D. P., Gall, I., Campbell, P., Frischauf, A. M. 1986. Isolation and Characterization of cDNA Clones from Mouse Skeletal Muscle Actin mRNA. *DNA* 5 (3), 235-238
 96. Lee, K. H., Sburlati, A., Renner, W. A., Bailey, J. E. 1996. Deregulated

- expression of cloned transcription factor E2F-1 in Chinese Hamster Ovary Cells shifts protein patterns and activates growth in protein-free medium. *Biotech. Bioeng.* 50 (3), 273-279
97. Lehmann, J., Vorlop, J., Büntemeyer, H. 1988. Bubble-free Reactors and their Development for Continuous Culture with Cell Recycle. In: Spier, R. E., Griffiths, J. B. (eds.), *Animal Cell Biotechnology* 3, 221-237. Academic Press London.
98. Leist, C. H., Meyer, H. P., Fiechter, A. 1990. Potential and Problems of Animal Cells in Suspension Culture. *J. Biotechn.* 15, 1-46
99. Lin, A. A., Nguyen, T., Miller, W. M. 1991. A rapid method for counting cell nuclei using a particle sizer/counter. *Biotech. Bioeng.* 5, 153-156
100. Lindl, T., Bauer, J. 1994. *Zell- und Gewebekultur. Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen.* Gustav Fischer Verlag Stuttgart, Jena, New York
101. Ljunggren, J., Häggström, L. 1992. Catabolic Control of Hybridoma Cells by Glucose and Glutamine Limited Fed Batch Cultures. *Biotech. Bioeng.* 44, 808-818
102. Lopez-Alarcon, L., Eboli, M. L. 1986. Oxidation of reduced cytosolic nicotinamide adenine dinucleotide by the malate-aspartate shuttle in the K-562 Human Leukemia cell line. *Cancer Res.* 46, 5589-5591
103. Lucas, B. K., Giere, L. M., De Marco, R. A., Shen, A., Chisholm, V., Crowley, C. W. 1996. High-level production of recombinant proteins in CHO cells using a dicistronic DHFR intron expression vector. *Nucleic Acids Res.* 24 (9), 1774-

1779

104. MacDonald, J. M. 1995. Feasability of a mitochondrial pyruvate malate shuttle in Pancreatic islets - Further implication of cytosolic NADPH in insulin secrecion. J. Biol. Chem. 270 (34), 20051-20058
105. Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. 1982. Molecular Cloning - A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory
106. Martinelle, K., Häggström, L. 1993. Mechanisms of ammonia and ammonium ion toxicity in animal cells: Transport across cell membranes. J. Biotechnol. 30, 339-350
107. Martinelle, K., Westlund, A., Häggström, L. 1996. Ammonium ion transport - a cause of cell death. Cytotechnology 22, 251-254
108. Martinelle, K., Häggström, L. 1998. Saturable ammonium ion transport in myeloma and hybridoma cells is mediated by the Na⁺K⁺2Cl⁻-cotransporter. Biotechnol. Lett. 20 (1), 81-86
109. McKeehan, W. L. 1982. Glycolysis, glutaminolysis and cell proliferation. Cell. Biol. Int. Reports 6, 635-650
110. McQueen, A., Bailey, J. E. 1991. Growth inhibition of hybridoma cells by ammonium ion: Correlation with effects of intracellular pH. Bioproc. Eng. 6, 49-61
111. Milbrandt, J. D., Azizkhan, J. C., Hamlin, J. L. 1983. Amplification of a cloned Chinese hamster dihydrofolate reductase gene after transfer into a dihydrofolate reductase-deficient cell line. Mol. Cell. Biol. 3, 1274-1282

-
112. Mildvan, S. A., Scrutton, C. M., Utter, M. F. 1966. Pyruvate Carboxylase. VII. A possible role for tightly bound manganese. *J. Biol. Chem.* 241 (15), 3488-3498
 113. Miller, W. M., Blanch, H. W., Wilke, C. R. 1988. A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous suspension culture: Effect of nutrient concentration, dilution rate, and pH. *Biotech. Bioeng.* 32, 947-965
 114. Miller, W. M., Wilke, C. R., Blanch, H. W. 1989a. The transient responses of hybridoma cells to nutrient additions in continuous culture: I. Glucose pulse and step changes. *Biotech. Bioeng.* 33, 477-486
 115. Miller, W. M., Wilke, C. R., Blanch, H. W. 1989b. The transient responses of hybridoma cells to nutrient additions in continuous culture: II. Glutamine pulse and step changes. *Biotech. Bioeng.* 33, 487-499
 116. Murray, K., Dickson, A. J., Gull, K. 1992. Metabolic Management of a Hybridoma Cell Line. In: ESACT, The 11th Meeting 11, 261.263
 117. Murray, K., Gull, K., Dickson, A. J. 1996. Dichloroacetate Increases Cell and Antibody Yields in Batch Cultures of a Hybridoma Cell Line. *Biotech. Bioeng.* 49, 377-382
 118. Nagira, K., Hara, T., Hayashida, M., Osada, K., Shiga, M., Sasamoto, K., Kina, K., Murakami, H. 1995. Development of a protein-free medium with iron salts replacing transferrin for a human-human hybridoma. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59 (4), 743-745
 119. Neermann, J., Wagner, R. 1996. Comparative Analysis of Glucose and Glutamine Metabolism in Transformed Mammalian Cell Lines, Insect and Primary Liver Cells. *J. Cell. Physiol.* 166, 152-169

-
120. Neermann, J. 1997. Charakterisierung des Primärenergiemetabolismus von Dauerzelllinien und seine gerichtete Veränderung durch Metabolic Control und Metabolic Engineering. Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
 121. Negrotti, M., Murray, K., Reidy, T. J., Krok, K., Seaver, S. S. 1989. Effects of glutamine and ammonia on hybridoma cell proliferation and antibody production/ Proceedings of the second engineering foundation conference on animal cell culture, Santa Barbara. 65
 122. Newland, M., Greenfield, P. F., Reid, S. 1990. Hybridoma growth limitations: The roles of energy metabolism and ammonia production. Cytotechnology 3, 215-229
 123. Nielsen, J. 1998. Metabolic Engineering: Techniques for Analysis of Targets for Genetic Manipulations. Biotech. Bioeng. 58, 125
 124. Nunberg, J. H., Kaufman, R. J., Schimke, R. T., Urlaub, G., Chasin, L. A. 1978. Amplified dihydrofolate reductase genes are localized to a homogenously staining region of a single chromosome in a methotrexate-resistant Chinese hamster ovary cell line. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5553-5556
 125. Oh, W. S. K., Vig, P., Teo, W. K., Yap, S. M. G. 1993. Substantial overproduction of antibodies by applying osmotic pressure and sodium butyrate. Biotech. Bioeng. 42, 601-610
 126. Ohta, K., Beall, D. S., Mejia, J. P., Shanmugam, K. T., Ingram, L. O. 1991. Metabolic engineering of *Klebsiella oxytoca* MSA1 for ethanol production from xylose and glucose. Appl. Environ. Microbiol. 57, 2810-2815

-
127. Oizumi, J., Ng, W. G., Donnell, G. N. 1986. Pyruvate Carboxylase defect: Metabolic studies on cultured skin fibroblasts. *J. Inher. Metab. Dis.* 9, 120-128
 128. Omasa, T., Higashiyama, K. I., Shioya, S., Suga, K. I. 1992. Effects of lactate concentration on Hybridoma culture in lactate-controlled fed-batch operation. *Biotech. Bioeng.* 39, 556-564
 129. Osmani, A. S., Scrutton, C. M., Mayer, F. 1985. The structure and regulation of fungal Pyruvate Carboxylases. *Ann. NY Acad. Sci.* 447, 56-71
 130. Oyaas, K., Ellingsen, T. E., Dyrset, N., Levine, D. W. 1994. Hyperosmotic hybridoma cell cultures: increased monoclonal antibody production with addition of glycine betaine. *Biotech. Bioeng.* 44, 991-998
 131. Ozturk, S. S., Riley, M. R., Palsson, B. O. 1992. Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production. *Biotech. Bioeng.* 39, 418-432
 132. O'Rourke, A. M., Rider, C. C. 1989. Glucose, glutamine and ketone body utilisation by resting and concanavalin A activated rat splenic lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1010, 342-345
 133. Park, H., Kim, I. H., Kim, I. Y., Kim, K. H., Kim, H. J. 2000. Expression of carbamoyl phosphate synthetase I and ornithine transcarbamoylase genes in Chinese hamster ovary dhfr-cells decreases accumulation of ammonium ion in culture media. *J. Biotechnol.* 81, 129-140
 134. Pels Rijcken, R. W., Overdijk, B., van den Eijnden, D., Ferwerda, W. 1995. The effect of increasing nucleotide-sugar concentrations on the incorporation of sugar into glycoconjugates in rat hepatocytes. *Biochem. J.* 305, 865-870

-
135. Pendse, G. J., Bailey, J. E. 1994. Effect of Vitreoscilla hemoglobin expression on growth and specific tissue plasminogen activator productivity in recombinant Chinese hamster ovary cells. *Biotech. Bioeng.* 44, 1367-1370
 136. Perez-Rodriguez, J., Sanchez-Jimenez, F., Marquez, J. F., Medina, A. M., Quesada, R. A., Castro Nunez de, I. 1987. Malate-citrate cycle during glycolysis and glutaminolysis in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochimie* 69, 469-474
 137. Petch, D., Butler, M. 1994. Profile of energy metabolism in a murine hybridoma: Glucose and glutamine utilization. *J. Cell Physiol.* 161, 71-76
 138. Poljak, L., Seum, C., Mattioni, T., Laemmli, U. K. 1994. SARs stimulate but do not confer position independent gene expression. *Nucl. Acids. Res.* 22 (21), 4386-4394
 139. Profos, P. 1988. *Kompendium der Grundlagen der Messtechnik*. Vulkan Verlag, Essen
 140. Puck, T. T. 1985. Development of the Chinese hamster ovary (CHO) cell for use in somatic cell genetics. In: Gottesman, M. M. (ed.), *Molecular Cell Genetics*, 37-64
 141. Randle, P. J., Fatania, H. R., Lau, K. S. 1984. Regulation of the mitochondrial branched chain 2-oxoacid dehydrogenase complex of animal tissue by reversible phosphorylation. In: Cohen, P.: *Molecular Aspects of Cellular Regulation*, Band 3, 1. Elsevier Verlag, Amsterdam
 142. Rasmussen, J. R. 1991. Glycosylation of recombinant proteins. In: *Biology of carbohydrates*. JAI Press, London, 179-285

-
143. Reddy, S., Bauer, K. D., Miller, W. M. 1992. Determination of antibody content in live versus dead hybridoma cells: Analysis of antibody production in osmotically stressed cultures. *Biotech. Bioeng.* 40, 947-964
 144. Reddy, S., Miller, W. M. 1994. Effects of abrupt and gradual osmotic stress on antibody production and content in hybridoma cells that differ in production kinetics. *Biotechnol. Prog.* 10, 165-173
 145. Reed, L. J., Damuni, Z., Merryfield, M. L. 1985. Regulation of mammalian pyruvate and branched chain alpha-keto acid dehydrogenase complexes by phosphorylation -dephosphorylation. *Curr. Top. Cell. Regul.* 27, 41-49
 146. Rees, W. D., Hay, S. M. 1995. The biosynthesis of threonine by mammalian cells: expression of a complete bacterial biosynthetic pathway in an animal cell. *Biochem. J.* 309, 999-1007
 147. Reitzer, L. J., Wice, B. M., Kennell, D. 1979. Evidence That Glutamine, Not Sugar, Is The Major Energy Source for Cultured HeLa Cells.. *J. Biol. Chem.* 254 (8), 2669-2676
 148. Reitzer, L. J., Wice, B. M., Kennell, D. 1980. The Pentose Cycle: Control And Essential Function in HeLa Cell Nucleic Acid Synthesis. *J. Biol. Chem.* 255 (12), 5616-5626
 149. Renner, W. A., Lee, K. H., Hatzimanikatis, V., Bailey, J. E., Eppenberger, H. M. 1995. Recombinant Cyclin E Expression Activates Proliferation And Obviates Surface Attachment of Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells in Protein-Free Medium. *Biotech. Bioeng.* 47, 476-482
 150. Ringold, G., Dieckmann, B., Lee, F. 1981. Co-Expression and amplification of

- Dihydrofolate Reductase cDNA and the Escherichia coli XGPRT gene in Chinese hamster ovary cells. *J. Mol. Appl. Gen.* 1, 165-175
151. Ruiz-Amil, M., De Torrontegui, G., Palacian, E., Losada, M. 1965. Properties and function of yeast pyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.* 240, 3485-3492
152. Ryll, T., Lucki-Lange, M., Jäger, V., Wagner, R. 1990. Production of Recombinant Human Interleukin-2 with BHK Cells in a Hollow Fibre and a Stirred Tank Reactor with Protein-free Medium. *J. Biotechnol.* 14, 377-392
153. Ryll, T., Wagner, R. 1991. Improved ion-pair high-performance liquid chromatographic method for the quantification of a wide variety of nucleotides and sugar-nucleotides in animal cells. *J. Chromatogr.* 570, 77-88
154. Ryll, T. 1992. Untersuchung intrazellulärer Ribonucleotidpools tierischer Zellkulturen für die Kontrolle von Produktionsprozessen. Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
155. Ryll, T., Wagner, R. 1992. Intracellular ribonucleotide pools as a tool for monitoring the physiological state of in vitro cultivated mammalian cells during production process. *Biotechnol. Bioeng.* 40, 934-946
156. Ryll, T., Valley, U., Wagner, R. 1994. Biochemistry of growth inhibition by ammonium ions in mammalian cells. *Biotech. Bioeng.* 44, 184-193
157. Ryu, S. J., Lee, G. M. 1997. Effect of hypoosmotic stress on hybridoma cell growth and antibody production. *Biotech. Bioeng.* 55, 565-570
158. Ryu, S. J., Lee, G. M. 1999. Application of hypoosmolar medium to fed-batch culture of hybridoma cells for improvement of culture longevity. *Biotech.*

Bioeng. 62, 120-123

159. Sahm, H. 1993. Metabolic Design. In: Rehm, H. J., Reed G. (eds.), Biotechnology Bd.1, 189-222, VCH, Weinheim
160. Sandig, V., Lieber, A., Strauss, M. 1997. Vectors for Gene Transfer and Expression in Animal Cells. In: Hauser, H., Wagner R. (eds.), Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production, 65-85. Walter de Gruyter Verlag Berlin
161. Scharfenberg, K., Wagner, R. 1995. A Reliable Strategy for the Achievement of Cell Lines Growing in Protein-free Medium. In: Beuvery, E.C., Griffiths, J.B., Zeijlemaker, W.P. (eds.), Animal Cell Technology: Developments towards the 21st Century, 619-623. Kluwer Acad. Pub., Dordrecht
162. Schlenke, P., Grabenhorst, E., Nimtz, M., Conradt, H. S. 1999. Construction and characterization of stably transfected BHK-21 cells with human-type sialylation characteristics: transfection with the human α -2,6-sialyltransferase gene leads to the biosynthesis of recombinant glycoproteins bearing NeuAc(α -2-6)Gal(β -1-4)GlcNAc-R and NeuAc(α -2-6)GalNAc(β -1-4)GlcNAc-R N-glycan motifs. Cytotechnology 30, 17-25
163. Scrutton, M. C., Olmstedt, M. R., Utter, M. F. 1969. Pyruvate Carboxylase from Chicken Liver. In: Lowenstein, J. M. (ed.), Methods in Enzymology: Citric acid cycle, vol. 13/38, 235-249
164. Selden, R. F., Howie, K. B., Rowe, M. E., Goodman, H. M., Moore, D. D. 1986. Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression. Mol. Cell. Biol., 6 (9), 3173-317
165. Singh, R. P., Emery, A. N., Al-Rubeai, M. 1996. Enhancement of survivability of mammalian cells by overexpression of the apoptosis suppressor gene bcl-2. Biotech. Bioeng. 52 (1), 166-175
166. Singhvi, R., Stephanopoulos, G., Wang, D. I. C. 1994. Review: Effects of

- Substratum Morphology on Cell Physiology. *Biotech. Bioeng.* 43, 764-771
167. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85
 168. Smithies, O., Gregg, R. G., Boggs, S. S., Koralewski, M. A., Kucherlapati, R. S. 1985. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal betaglobin locus by homologous recombination. *Nature* 317, 230-234
 169. Spencer, S. C. 1991. Electroporation technique of DNA transfection. In: Murray, E. J. (ed.), *Gene Transfer and Expression Protocols*, 45-52. Humana Press, Clifton, New Jersey
 170. Stephanopoulos, G., Vallino, J. J. 1991. Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. *Science* 252, 1675-1681
 171. Stephanopoulos, G., Sinskey, A. J. 1993. Metabolic Engineering - methodologies and future prospects. *Tibtech* 11, 392-396
 172. Stryer, L. 1990. *Biochemie*. Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft, Heidelberg
 173. Stucka, R., Dequin, S., Salmon, J.-M., Gancedo, C. 1991. DNA sequences in chromosomes II and VII code for pyruvate carboxylase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of pyruvate carboxylase deficient strains. *Mol. Gen. Genet.* 229, 307-315
 174. Sureshkumar, G. K., Mutharasan, R. 1991. The influence of temperature on a mouse-mouse hybridoma growth and monoclonal antibody production. *Biotech. Bioeng.* 37, 292-295
 175. Thyagarajan, B., Olivares, E. C., Hollis, R. P., Ginsburg, D. S., Calos, M. P. 2001. Site-Specific Genomic Integration in Mammalian Cells Mediated by Phage ϕ C31 Integrase. *Mol. Cell. Biol.* 21(12), 3926-3934

-
176. Trasks, B. J., Hamlin, J. L. 1989. Early dihydrofolate reductase gene amplification events in CHO cells usually occur on the same chromosome arm as the original locus. *Genes Dev.* 3, 1913-1925
 177. Tritsch, G. L., Moore, G. E. 1962. Spontaneous decomposition of glutamine in cell culture media. *Exp. Cell. Res.* 28, 360-364
 178. Tsai, P. S., Rao, G., Bailey, J. E. 1995. Improvement of *Escherichia coli* Microaerobic Oxygen Metabolism by Vitreoscilla Hemoglobin: New Insights from NAD(P)H Fluorescence and Culture Redox Potential. *Biotech. Bioeng.* 47, 347-354
 179. Tsuda, E., Kawanshi, G., Ueda, M.; Masuda, S.; Sasaki, R. 1990. The Role of Carbohydrate in Recombinant Erythropoietin. *Eur. J. Biochem.* 188, 405-411
 180. Urlaub, G., Chasin, L. A. 1980. Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 4216-4220
 181. Urlaub, G., Kas, E., Carothers, A. M., Chasin, L. A. 1983. Deletion of the Diploid Dihydrofolate Reductase Locus from Cultured Mammalian Cells. *Cell* 33, 405-412
 182. Urlaub, G., Mitchell, P. J., Kas, E., Chasin, L. A., Funanage, V. L., Myoda, T. T., Hamlin, J. L. 1986. The Effect of Gamma Rays at the Dihydrofolate Reductase Locus: Deletions and Inversions. *Somatic Cell and Mol. Gen.* 12, 555-566
 183. Utter, F. M., Barden, E. R., Taylor, L. B. 1975. Pyruvate carboxylase: an evaluation of the relationships between structure and mechanism and between structure and catalytic activity. *Adv. Enzymol.* 42, 1-72
 184. Val, D. L., Chapman-Smith, A., Walker, M. E., Cronan, J. E., Wallace, J. C. 1995. Polymorphism of the yeast pyruvate carboxylase 2 gene and protein: effects on protein biotinylation
 185. Valley, U. 1996. UDP-aktivierte N-acetylierte Hexosamine als zentrale

Effektoren bei Wachstum und Proteinglycosylierung in rekombinanten BHK-Zellen. Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

186. Valley, U., Nimtz, M., Conradt, H. S., Wagner, R. 1999. Incorporation of ammonium into intracellular UDP-activated N-Acetylhexosamines and into carbohydrate structures in glycoproteins. *Biotech. Bioeng.* 64, 402-417
187. Vandekerckhove, J., Weber, K. 1979. The complete amino acid sequence of actins from bovine aorta, bovine heart, bovine fast skeletal muscle and rabbit slow skeletal muscle. A protein-chemical analysis of muscle actin differentiation. *Differentiation* 14, 123-133
188. Vriezen, N. 1998. Physiology of mammalian cells in suspension culture. Dissertation, Technische Universität Delft
189. Vriezen, N., van Dijken, J. P. 1998. Fluxes and enzyme activities in central metabolism of myeloma cells grown in chemostat culture. *Biotech. Bioeng.* 59 (1), 28-39
190. Wagner, R., Irani, N., Wirth, M., van den Heuvel, J. 1998. Process for the improvement of the primary energy metabolism of mammalian cell lines. International Patent PCEP98/07484
191. Walker, M. E., Val, D., Rohde, M., Devenish, R. J., Wallace, J. C. 1991. Yeast pyruvate carboxylase: Identification of two genes encoding isoenzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176, 1210-1217
192. Walsh, G., Headon, D. 1994. Therapeutic proteins: blood products, vaccines, monoclonal antibodies and related substances. *Protein Biotechnology*, Bd. 1, 1. Auflage, 163-208. John Wiley & Sons, New York
193. Warburg, O. 1930. The metabolism of tumors. Constable Verlag, London
194. Waugh, A. 1999. Culturing Animal Cells in Fluidized Bed Reactors. In: *Methods in Biotechnology*, Vol. 8: Animal Cell Biotechnology, Jenkins, N. (ed.), 179-185,

Humana Press Inc., Totowa, NJ

195. Weidemann, R., Ludwig, A., Kretzmer, G. 1994. Low temperature cultivation - A step towards process optimisation. *Cytotechnol.* 15, 111-116
196. Winterburn, P. J., Phelps, C. F. 1971. Purification and some kinetic properties of rat liver glucosamine synthetase. *Biochem. J.* 121, 701-709
197. Wirth, M., Bode, J., Zettlmeissl, G., Hauser, H. 1988. Isolation of overproducing recombinant mammalian cell lines by a rapid and simple detection procedure. *Gene* 73, 419-426
198. Wirth, M. 1997. Isolation of Recombinant Cell Clones Exhibiting High-Level Expression of the Introduced Gene. In: Hauser, H., Wagner R. (eds.), *Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production*, 121-138. Walter de Gruyter Verlag Berlin
199. Wood, H. G., Barden, R. E. 1977. Biotin enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 46, 385-413
200. Wurm, F. M., Gwinn, K. A., Kingston, R. E. 1986. Inducible overexpression of the mouse c-myc protein in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. USA* 83, 5414-5418
201. Wurm, F. M., Johnson, A., Lie, Y., Etcheverry, T. M., Anderson, K. P. 1992. Host cell derived retroviral sequences enhance transfection and expression efficiency in CHO cells. In: Spier, Griffiths, MacDonald (eds.), *Animal Cell Technology: Developments, Processes and Products*, 35-41
202. Wurm, F. 1997. Aspects of Gene Transfer and Gene Amplification. In: Wagner R. (eds.), *Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production*, 87-120. Walter de Gruyter Verlag Berlin
203. Wylegalla, C., Meyer, R., Wagner, K. G. 1985. Nucleotide pools in suspension-cultured cells of *Datura innoxia*. *Planta* 166, 446-451

-
204. Xie, L., Wang, D. I. C. 1994a. Stoichiometric Analysis of Animal Cell Growth and Its Application in Medium Design. *Biotech. Bioeng.* 43, 1164-1174
205. Xie, L., Wang, D. I. C. 1994b. Fed-Batch Cultivation of Animal Cells Using Different Medium Design Concepts and Feeding Strategies. *Biotech. Bioeng.* 43, 1175-1189
206. Yoshikawa, T., Nakanishi, F., Ogura, Y., Oi, D., Omasa, T., Katakura, Y., Kishimoto, M., Suka, K. 2000. Amplified gene location in chromosomal DNA affected recombinant protein production and stability of amplified genes. *Biotechnol. Prog.* 16 (5), 710-715
207. Zang, M., Trautmann, H., Gandor, C., Messi, F., Asselbergs, F., Leist, C., Fiechter, A., Reiser, J. 1995. Production of recombinant proteins in Chinese hamster ovary cells using a protein-free cell culture medium. *Bio/Technology* 13, 389-392
208. Zeng, A.-P., Deckwer, W.-D. 1995. Mathematical Modeling and Analysis of Glucose and Glutamine Utilization and Regulation in Cultures of Continuous Mammalian Cells. *Biotech. Bioeng.* 47, 334-346
209. Zheng, H., Wilson, J. H. 1990. Gene targeting in normal and amplified cell lines. *Nature* 344, 170-173
210. Zielke, H. R., Ozand, P. T., Tilson, J. T. 1978. Reciprocal Regulation of Glucose And Glutamine Utilisation by Cultured Human Diploid Fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* 95, 41-48
211. Zielke, H. R., Sumbilla, C. M., Sevdalian, D. A., Hawkins, R. L., Ozand, P. T. 1980. Lactate: A Major Source of Glutamine Metabolism by Human Diploid Fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* 104, 433-441
212. Zielke, H. R., Zielke, C. L., Ozand, P. T. 1984. Glutamine: a major energy source for cultured mammalian cells. *Fed. Proceed.* 43 (1), 121-125

7 Anhang

Vergleich der Sequenzierungen des PYC2-Gens durch Seqlab (pyc2_Seqlab) und Eli Lilly (pyc2_EliLilly) mit in der Literatur angegebenen PYC2-Sequenzen (pyc2_Stucka, Stucka et al., 1991; pyc2_Val, Val et al., 1995) und einer in der EMBL-Datenbank aufgeführten PYC2-Sequenz (pyc2_scybr217c)

	1				50
pyc2_Seqlab
pyc2_scybr218c
pyc2_Stucka
pyc2_Val	GATCTTTT	TGTTACTACAG	GAAGCAGAAA	CAAAATGAGA	TATCAATACC
pyc2_EliLilly
	51				100
pyc2_Seqlab
pyc2_scybr218c
pyc2_Stucka
pyc2_Val	AGTGTAAATC	TGTTAATGAG	AATCATCACA	TTATCCCAGT	TTTTTCCATG
pyc2_EliLilly
	101				150
pyc2_Seqlab
pyc2_scybr218c
pyc2_Stucka
pyc2_Val	CAAGGGAAAA	ATATACTATA	CGACATTTCT	ATACTTTAAT	TATCAATTAA
pyc2_EliLilly
	151				200
pyc2_SeqlabCC	CTATTGACGG	CCAAGCGGNA
pyc2_scybr218c
pyc2_Stucka
pyc2_Val	GGTCATCTTT	CTGTACGAAA	ACTAACCACG	ATTGTCAC	TACGACGTGTC
pyc2_EliLilly

	201		250
pyc2_Seqlab	AATGGCCCGC	GGGCATTAAT	GCCCAAGAAC ATGCCTTANG GGACTTTCCC
pyc2_scybr218c
pyc2_Stucka
pyc2_Val	CCTTACCCGA	CGCAGCTGCT	GATAGCTACC GCACAGGCAC AGCCAG.CTC
pyc2_EliLilly
	251		300
pyc2_Seqlab	TACTGGCCAG	GACATNTAGG	TATTAGTCAT CGCTATTACN ATGNTAATGC
pyc2_scybr218c
pyc2_Stucka
pyc2_Val	TTCTGTGATT	GGCAGAGAGG	GGTCCTTCCT GCGGAAGACG CCGCAAAGGC
pyc2_EliLilly
	301		350
pyc2_Seqlab	GGTTTTGGCC	A...GTACAT	CAATGGGNGT GAAAGCGGTT TNACTCACGG
pyc2_scybr218c
pyc2_Stucka
pyc2_Val	ACATATGACT	AACCTTTTTT	TTTTCGCAAT TAATTTTCTA ATAGTTTTTC
pyc2_EliLilly
	351		400
pyc2_Seqlab	GGATTTCCCA	AGTCTCCACC	CCATTGACGT CAATGGGAGT TTGTTTGGCC
pyc2_scybr218c
pyc2_Stucka
pyc2_Val	ATTTTTTTTT	TACAATTTTG	GCAGTTACGT CTCGAGCTAT TTATTATAAG
pyc2_EliLilly
	401		450
pyc2_Seqlab	ACAAAATCAA	CGGGACTTTC	CAAAATGTCG TAACAACTCC GCCCCATTG
pyc2_scybr218cTAAG TAAGAAGTAC TCCCC.AT..
pyc2_Stucka
pyc2_Val	AGTCAG..AA	TTGGCGCAGG	GAGTGTTAAG TAAGAAGTAC TCCCC.AT..
pyc2_EliLilly

	451		500
pyc2_Seqlab	ACGCAAATGG	GCGGTAG.GC	GTGTACGGTG GGAGGTC..T ATATAAGCAG
pyc2_scybr218c	.CGGATATTT	CCTATTGTGT	TTCTGTGATT TTTAGTCCTT TTTTCTTTTC
pyc2_Stucka
pyc2_Val	.CGGATATTT	CCTATTGTGT	TTCTGTGATT TTTAGTCCTT TTTTCTTTTC
pyc2_EliLilly
	501		550
pyc2_Seqlab	AGCTCGTTTA	GTGAACCGTC	..AGATCGCC TGGAGACGCC ATCCACGCTG
pyc2_scybr218c	TCTTACTTTC	GGTATCCTTA	CTTGATTACA TACATAAACA AGCCCCCTCTT
pyc2_Stucka
pyc2_Val	TCTTACTTTC	GGTATCCTTA	CTTGATTACA TACATAAACA AGCCCCCTCTT
pyc2_EliLilly
	551		600
pyc2_Seqlab	TT.TTGACCT	CCATAGAAGA	CACCGGGACC GATCCAGCCT CCGGGGGATC
pyc2_scybr218c	TTCTTCCAAA	CTCTTGTAGC	TTACTATCTG TGGCCCGTCA TTTGAGTTTG
pyc2_Stucka
pyc2_Val	TTCTTCCAAA	CTCTTGTAGC	TTACTATCTG TGGCCCGTCA TTTGAGTTTG
pyc2_EliLilly
	601		650
pyc2_Seqlab	TCGAGGAACT	GAAAAACCAG	AAAGTTAACT GGTAAGTTTA GTCTTTTTTGT
pyc2_scybr218c	ATTTTTTTGC	CAATTACTAT	ATTGCAAAAT A..AAGGACA GTTACTAGGA
pyc2_Stucka
pyc2_Val	ATTTTTTTGC	CAATTACTAT	ATTGCAAAAT A..AAGGACA GTTACTAGGA
pyc2_EliLilly
	651		700
pyc2_Seqlab	CTTTTATTTT	AGGTCCCGGA	TCGAAGCTTT AAAATATGAG CAGTAGCAAG
pyc2_scybr218c	GAGAAAATAA	GGGACATAGA	GAACAAAAT. AAAATATGAG CAGTAGCAAG
pyc2_StuckaATGAG CAGTAGCAAG
pyc2_Val	GAGAAAATAA	GGGACATAGA	GAACAAAAT. AAAATATGAG CAGTAGCAAG
pyc2_EliLillyATGAG CAGTAGCAAG

	701		750
pyc2_Seqlab	AAATTGGCCG GTCTTAGGGA CAATTTTCAGT TTGCTCGGCG AAAAGAATAA		
pyc2_scybr218c	AAATTGGCCG GTCTTAGGGA CAATTTTCAGT TTGCTCGGCG AAAAGAATAA		
pyc2_Stucka	AAATTGGCCG GTCTTAGGGA CAATTTCTGT TTGCTCGGCG AAAAGAATAA		
pyc2_Val	AAATTGGCCG GTCTTAGGGA CAATTTTCAGT TTGCTCGGCG AAAAGAATAA		
pyc2_EliLilly	AAATTGGCCG GTCTTAGGGA CAATTTTCAGT TTGCTCGGCG AAAAGAATAA		
	751		800
pyc2_Seqlab	GATCTTGGTC GCCAATAGAG GTGAAATTCC GATTAGAATT TTTAGATCTG		
pyc2_scybr218c	GATCTTGGTC GCCAATAGAG GTGAAATTCC GATTAGAATT TTTAGATCTG		
pyc2_Stucka	GATCTTGGTC GCCAATAGAG GTGAAATTCC GATTAGAATT TTTAGATCTG		
pyc2_Val	GATCTTGGTC GCCAATAGAG GTGAAATTCC GATTAGAATT TTTAGATCTG		
pyc2_EliLilly	GATCTTGGTC GCCAATAGAG GTGAAATTCC GATTAGAATT TTTAGATCTG		
	801		850
pyc2_Seqlab	CTCATGAGCT GTCTATGAGA ACTATCGCCA TATACTCCCA CGAGGACCGT		
pyc2_scybr218c	CTCATGAGCT GTCTATGAGA ACCATCGCCA TATACTCCCA TGAGGACCGT		
pyc2_Stucka	CTCATGAGCT GTCTATGAGA ACTATCGCCA TATACTCCCA CGAGGACCGT		
pyc2_Val	CTCATGAGCT GTCTATGAGA ACCATCGCCA TATACTCCCA TGAGGACCGT		
pyc2_EliLilly	CTCATGAGCT GTCTATGAGA ACTATCGCCA TATACTCCCA CGAGGACCGT		
	851		900
pyc2_Seqlab	CTTTCAATGC ATAGGTTGAA GGCGGACGAA GCGTATGTTA TCGGGGAGGA		
pyc2_scybr218c	CTTTCAATGC ACAGGTTGAA GGCGGACGAA GCGTATGTTA TCGGGGAGGA		
pyc2_Stucka	CTTTCAATGC ATAGGTTGAA GGCGGACGAA GCGTATGTTA TCGGGGAGGA		
pyc2_Val	CTTTCAATGC ACAGGTTGAA GGCGGACGAA GCGTATGTTA TCGGGGAGGA		
pyc2_EliLilly	CTTTCAATGC ATAGGTTGAA GGCGGACGAA GCGTATGTTA TCGGGGAGGA		
	901		950
pyc2_Seqlab	GGGCCAGTAT ACACCTGTGG GTGCTTACTT GGCAATGGAC GAGATCATCG		
pyc2_scybr218c	GGGCCAGTAT ACACCTGTGG GTGCTTACTT GGCAATGGAC GAGATCATCG		
pyc2_Stucka	GGGCCAGTAT ACACCTGTGG GTGCTTACTT GGCAATGGAC GAGATCATCG		
pyc2_Val	GGGCCAGTAT ACACCTGTGG GTGCTTACTT GGCAATGGAC GAGATCATCG		
pyc2_EliLilly	GGGCCAGTAT ACACCTGTGG GTGCTTACTT GGCAATGGAC GAGATCATCG		

	951		1000
pyc2_Seqlab	AAATTGCAAA GAAGCATAAG GTGGATTTC	TCCATCCAGG TTATGGGTTC	
pyc2_scybr218c	AAATTGCAAA GAAGCATAAG GTGGATTTC	TCCATCCAGG TTATGGGTTC	
pyc2_Stucka	AAATTGCAAA GAAGCATAAG GTGGATTTC	TCCATCCAGG TTATGGGTTC	
pyc2_Val	AAATTGCAAA GAAGCATAAG GTGGATTTC	TCCATCCAGG TTATGGGTTC	
pyc2_EliLilly	AAATTGCAAA GAAGCATAAG GTGGATTTC	TCCATCCAGG TTATGGGTTC	
	1001		1050
pyc2_Seqlab	TTGTCTGAAA ATTCGGAATT TGCCGACAAA	GTAAGTGAAGG CCGGTATCAC	
pyc2_scybr218c	TTGTCTGAAA ATTCGGAATT TGCCGACAAA	GTAAGTGAAGG CCGGTATCAC	
pyc2_Stucka	TTGTCTGAAA ATTCGGAATT TGCCGACAAA	GTAAGTGAAGG CCGGTATCAC	
pyc2_Val	TTGTCTGAAA ATTCGGAATT TGCCGACAAA	GTAAGTGAAGG CCGGTATCAC	
pyc2_EliLilly	TTGTCTGAAA ATTCGGAATT TGCCGACAAA	GTAAGTGAAGG CCGGTATCAC	
	1051		1100
pyc2_Seqlab	TTGGATTGGC CCTCCAGCTG AAGTTATTGA	ATCTGTGGGT GACAAAGTCT	
pyc2_scybr218c	TTGGATTGGC CCTCCAGCTG AAGTTATTGA	CTCTGTGGGT GACAAAGTCT	
pyc2_Stucka	TTGGATTGGC CCTCCAGCTG AAGTTATTGA	ATCTGTGGGT GATAAGGTCT	
pyc2_Val	TTGGATTGGC CCTCCAGCTG AAGTTATTGA	CTCTGTGGGT GACAAAGTCT	
pyc2_EliLilly	TTGGATTGGC CCTCCAGCTG AAGTTATTGA	ATCTGTGGGT GACAAAGTCT	
	1101		1150
pyc2_Seqlab	CTGCCAGACA CTTGGCAGCA AGAGCTAACG	TTCCTACCGT TCCCGGTACT	
pyc2_scybr218c	CTGCCAGACA CTTGGCAGCA AGAGCTAACG	TTCCTACCGT TCCCGGTACT	
pyc2_Stucka	CTGCCAGACA CTTGGCAGCA AGAGCTAACG	TTCCTACCGT TCCCGGTACC	
pyc2_Val	CTGCCAGACA CTTGGCAGCA AGAGCTAACG	TTCCTACCGT TCCCGGTACT	
pyc2_EliLilly	CTGCCAGACA CTTGGCAGCA AGAGCTAACG	TTCCTACCGT TCCCGGTACT	
	1151		1200
pyc2_Seqlab	CCAGGACCTA TCGAAACTGT GCAAGAGGCA	CTTGACTTCG TTAATGAATA	
pyc2_scybr218c	CCAGGACCTA TCGAAACTGT GCAAGAGGCA	CTTGACTTCG TTAATGAATA	
pyc2_Stucka	CCAGGACCTA TCGAAACTGT GCAAGAGGCA	CTTGACTTCG TTAATGAATA	
pyc2_Val	CCAGGACCTA TCGAAACTGT GCAAGAGGCA	CTTGACTTCG TTAATGAATA	
pyc2_EliLilly	CCAGGACCTA TCGAAACTGT GCAAGAGGCA	CTTGACTTCG TTAATGAATA	

	1201		1250
pyc2_Seqlab	CGGCTACCCG GTGATCATTA AGGCCGCCTT TGGTGGTGGT GGTAGAGGTA		
pyc2_scybr218c	CGGCTACCCG GTGATCATTA AGGCCGCCTT TGGTGGTGGT GGTAGAGGTA		
pyc2_Stucka	CGGCTACCCG GTGATCATTA AGGCCGCCTT TGGTGGTGGT GGTAGAGGTA		
pyc2_Val	CGGCTACCCG GTGATCATTA AGGCCGCCTT TGGTGGTGGT GGTAGAGGTA		
pyc2_EliLilly	CGGCTACCCG GTGATCATTA AGGCCGCCTT TGGTGGTGGT GGTAGAGGTA		
	1251		1300
pyc2_Seqlab	TGAGAGTCGT TAGAGAAGGT GACGACGTGG CAGATGCCTT TCAACGTGCT		
pyc2_scybr218c	TGAGAGTCGT TAGAGAAGGT GACGACGTGG CAGATGCCTT TCAACGTGCT		
pyc2_Stucka	TGAGAGTCGT TAGAGAAGGT GACGACGTGG CAGATGCCTT TCAACGTGCT		
pyc2_Val	TGAGAGTCGT TAGAGAAGGT GACGACGTGG CAGATGCCTT TCAACGTGCT		
pyc2_EliLilly	TGAGAGTCGT TAGAGAAGGT GACGACGTGG CAGATGCCTT TCAACGTGCT		
	1301		1350
pyc2_Seqlab	ACCTCCGAAG CCCGTACTGC CTTCGGTAAT GGTACCTGCT TTGTGGAAAG		
pyc2_scybr218c	ACCTCCGAAG CCCGTACTGC CTTCGGTAAT GGTACCTGCT TTGTGGAAAG		
pyc2_Stucka	ACCTCCGAAG CCCGTACTGC CTTCGGTAAT GGTACCTGCT TTGTGGAAAG		
pyc2_Val	ACCTCCGAAG CCCGTACTGC CTTCGGTAAT GGTACCTGCT TTGTGGAAAG		
pyc2_EliLilly	ACCTCCGAAG CCCGTACTGC CTTCGGTAAT GGTACCTGCT TTGTGGAAAG		
	1351		1400
pyc2_Seqlab	ATTCTTGAC AAGCCAAAGC ATATTGAAGT TCAATTGTTG GCTGATAAMC		
pyc2_scybr218c	ATTCTTGAC AAGCCAAAGC ATATTGAAGT TCAATTGTTG GCTGATAACC		
pyc2_Stucka	ATTCTTGAC AAGCCAAAGC ATATTGAAGT TCAATTGTTG GCTGATAAAC		
pyc2_Val	ATTCTTGAC AAGCCAAAGC ATATTGAAGT TCAATTGTTG GCTGATAACC		
pyc2_EliLilly	ATTCTTGAC AAGCCAAAGC ATATTGAAGT TCAATTGTTG GCTGATAACC		
	1401		1450
pyc2_Seqlab	ACGGAAACGT GGTTTCATCTT TTCGAAAGAG ACTGTTCTGT GCAAAGAAGA		
pyc2_scybr218c	ACGGAAACGT GGTTTCATCTT TTCGAAAGAG ACTGTTCTGT GCAAAGAAGA		
pyc2_Stucka	ACGGAAACGT GGTTTCATCTT TTCGAAAGAG ACTGTTCTGT GCAAAGAAGA		
pyc2_Val	ACGGAAACGT GGTTTCATCTT TTCGAAAGAG ACTGTTCTGT GCAAAGAAGA		
pyc2_EliLilly	ACGGAAACGT GGTTTCATCTT TTCGAAAGAG ACTGTTCTGT GCAAAGAAGA		

	1451		1500
pyc2_Seqlab	CACCAAAAAG	TTGTCGAAGT	CGCTCCAGCA AAGACTTTGC CCCGTGAAGT
pyc2_scybr218c	CACCAAAAAG	TTGTCGAAGT	CGCTCCAGCA AAGACTTTGC CCCGTGAAGT
pyc2_Stucka	CACCAAAAAG	TTGTCGAAGT	CGCTCCAGCA AAGACTTTCC CCCGTGAAGT
pyc2_Val	CACCAAAAAG	TTGTCGAAGT	CGCTCCAGCA AAGACTTTGC CCCGTGAAGT
pyc2_EliLilly	CACCAAAAAG	TTGTCGAAGT	CGCTCCAGCA AAGACTTTGC CCCGTGAAGT
	1501		1550
pyc2_Seqlab	TCGTGACGCT	ATTTTGACAG	ATGCTGTTAA ATTAGCTAAG GTATGTGGTT
pyc2_scybr218c	TCGTGACGCT	ATTTTGACAG	ATGCTGTTAA ATTAGCTAAG GTATGTGGTT
pyc2_Stucka	TCGTGACGCT	ATTTTGACAG	ATGCTGTTAA ATTAGCTAAG GTATGTGGTT
pyc2_Val	TCGTGACGCT	ATTTTGACAG	ATGCTGTTAA ATTAGCTAAG GTATGTGGTT
pyc2_EliLilly	TCGTGACGCT	ATTTTGACAG	ATGCTGTTAA ATTAGCTAAG GTATGTGGTT
	1551		1600
pyc2_Seqlab	ACAGAAACGC	AGGTACCGCC	GAATTCTTGG TTGACAACCA AAACAGACAC
pyc2_scybr218c	ACAGAAACGC	AGGTACCGCC	GAATTCTTGG TTGACAACCA AAACAGACAC
pyc2_Stucka	ACAGAAACGC	AGGTACCGCC	GAATTCTTGG TTGACAACCA AAACAGACAC
pyc2_Val	ACAGAAACGC	AGGTACCGCC	GAATTCTTGG TTGACAACCA AAACAGACAC
pyc2_EliLilly	ACAGAAACGC	AGGTACCGCC	GAATTCTTGG TTGACAACCA AAACAGACAC
	1601		1650
pyc2_Seqlab	TATTTTCATTG	AAATTAATCC	AAGAATTCAA GTGGAGCATA CCATCACTGA
pyc2_scybr218c	TATTTTCATTG	AAATTAATCC	AAGAATTCAA GTGGAGCATA CCATCACTGA
pyc2_Stucka	TATTTTCATTG	AAATTAATCC	AAGAATTCAA GTGGAGCATA CCATCACTGA
pyc2_Val	TATTTTCATTG	AAATTAATCC	AAGAATTCAA GTGGAGCATA CCATCACTGA
pyc2_EliLilly	TATTTTCATTG	AAATTAATCC	AAGAATTCAA GTGGAGCATA CCATCACTGA
	1651		1700
pyc2_Seqlab	AGAAATCACC	GGTATTGACA	TTGTTTCTGC CCAAATCCAG ATTGCCGCAG
pyc2_scybr218c	AGAAATCACC	GGTATTGACA	TTGTTTCTGC CCAAATCCAG ATTGCCGCAG
pyc2_Stucka	AGAAATCACC	GGTATTGACA	TTGTTTCTGC CCAAATCCAG ATTGCCGCAG
pyc2_Val	AGAAATCACC	GGTATTGACA	TTGTTTCTGC CCAAATCCAG ATTGCCGCAG
pyc2_EliLilly	AGAAATCACC	GGTATTGACA	TTGTTTCTGC CCAAATCCAG ATTGCCGCAG

	1701		1750
pyc2_Seqlab	GTGCCACTTT	GACTCAACTA	GGTCTATTAC AGGATAAAAAT CACCACCCGT
pyc2_scybr218c	GTGCCACTTT	GACTCAACTA	GGTCTATTAC AGGATAAAAAT CACCACCCGT
pyc2_Stucka	GTGCCACTTT	GACTCAACTA	GGTCTATTAC AGGATAAAAAT CACCACCCGT
pyc2_Val	GTGCCACTTT	GACTCAACTA	GGTCTATTAC AGGATAAAAAT CACCACCCGT
pyc2_EliLilly	GTGCCACTTT	GACTCAACTA	GGTCTATTAC AGGATAAAAAT CACCACCCGT
	1751		1800
pyc2_Seqlab	GGGTTTTCCA	TCCAATGTCG	TATTACCACT GAAGATCCCCT CTAAGAATTT
pyc2_scybr218c	GGGTTTTCCA	TCCAATGTCG	TATTACCACT GAAGATCCCCT CTAAGAATTT
pyc2_Stucka	GGGTTTTCCA	TCCAATGTCG	TATTACCACT GAAGATCCCCT CTAAGAATTT
pyc2_Val	GGGTTTTCCA	TCCAATGTCG	TATTACCACT GAAGATCCCCT CTAAGAATTT
pyc2_EliLilly	GGGTTTTCCA	TCCAATGTCG	TATTACCACT GAAGATCCCCT CTAAGAATTT
	1801		1850
pyc2_Seqlab	CCAACCGGAT	ACCGGTCGCC	TGGAGGTCTA TCGTTCTGCC GGTGGTAATG
pyc2_scybr218c	CCAACCGGAT	ACCGGTCGCC	TGGAGGTCTA TCGTTCTGCC GGTGGTAATG
pyc2_Stucka	CCAACCGGAT	ACCGGTCGCC	TGGAGGTCTA TCGTTCTGCC GGTGGTAATG
pyc2_Val	CCAACCGGAT	ACCGGTCGCC	TGGAGGTCTA TCGTTCTGCC GGTGGTAATG
pyc2_EliLilly	CCAACCGGAT	ACCGGTCGCC	TGGAGGTCTA TCGTTCTGCC GGTGGTAATG
	1851		1900
pyc2_Seqlab	GTGTGAGATT	GGACGGTGGT	AACGCTTATG CAGGTGCTAC TATCTCGCCT
pyc2_scybr218c	GTGTGAGATT	GGACGGTGGT	AACGCTTATG CAGGTGCTAC TATCTCGCCT
pyc2_Stucka	GTGTGAGATT	GGACGGTGGT	AACGCTTATG CAGGTGCTAC TATCTCGCCT
pyc2_Val	GTGTGAGATT	GGACGGTGGT	AACGCTTATG CAGGTGCTAC TATCTCGCCT
pyc2_EliLilly	GTGTGAGATT	GGACGGTGGT	AACGCTTATG CAGGTGCTAC TATCTCGCCT
	1901		1950
pyc2_Seqlab	CACTACGACT	CAATGCTGGT	CAAAATGTTCA TGCTCTGGTT CTACTTATGA
pyc2_scybr218c	CACTACGACT	CAATGCTGGT	CAAAATGTTCA TGCTCTGGTT CTACTTATGA
pyc2_Stucka	CACTACGACT	CAATGCTGGT	CAAAATGTTCA TGCTCTGGTT CTACTTATGA
pyc2_Val	CACTACGACT	CAATGCTGGT	CAAAATGTTCA TGCTCTGGTT CTACTTATGA
pyc2_EliLilly	CACTACGACT	CAATGCTGGT	CAAAATGTTCA TGCTCTGGTT CTACTTATGA

	1951		2000
pyc2_Seqlab	AATCGTCCGT	AGGAAGATGA	TTCGTGCCCT GATCGAATTC AGAATCAGAG
pyc2_scybr218c	AATCGTCCGT	AGGAAGATGA	TTCGTGCCCT GATCGAATTC AGAATCAGAG
pyc2_Stucka	AATCGTCCGT	AGGAAGATGA	TTCGTGCCCT GATCGAATTC AGAATCAGAG
pyc2_Val	AATCGTCCGT	AGGAAGATGA	TTCGTGCCCT GATCGAATTC AGAATCAGAG
pyc2_EliLilly	AATCGTCCGT	AGGAAGATGA	TTCGTGCCCT GATCGAATTC AGAATCAGAG
	2001		2050
pyc2_Seqlab	GTGTTAAGAC	CAACATTCCC	TTCCTATTGA CTCTTTTGAC CAATCCAGTT
pyc2_scybr218c	GTGTTAAGAC	CAACATTCCC	TTCCTATTGA CTCTTTTGAC CAATCCAGTT
pyc2_Stucka	GTGTGAAGAC	CAACATTCCC	TTCCTATTGA CTCTTTTGAC CAATCCAGTT
pyc2_Val	GTGTTAAGAC	CAACATTCCC	TTCCTATTGA CTCTTTTGAC CAATCCAGTT
pyc2_EliLilly	GTGTTAAGAC	CAACATTCCC	TTCCTATTGA CTCTTTTGAC CAATCCAGTT
	2051		2100
pyc2_Seqlab	TTTATTGAGG	GTACTTACTG	GACGACTTTT ATTGACGACA CCCCACTT
pyc2_scybr218c	TTTATTGAGG	GTACATACTG	GACGACTTTT ATTGACGACA CCCCACTT
pyc2_Stucka	TTTATTGAGG	GTACTTACTG	GACGACTTTT ATTGACGACA CCCCACTT
pyc2_Val	TTTATTGAGG	GTACATACTG	GACGACTTTT ATTGACGACA CCCCACTT
pyc2_EliLilly	TTTATTGAGG	GTACTTACTG	GACGACTTTT ATTGACGACA CCCCACTT
	2101		2150
pyc2_Seqlab	GTTCCAAATG	GTATCATCAC	AAAACAGAGC GCAAAAACTG TTACACTATT
pyc2_scybr218c	GTTCCAAATG	GTATCGTCAC	AAAACAGAGC GCAAAAACTG TTACACTATT
pyc2_Stucka	GTTCCAAATG	GTATCATCAC	AAAACAGAGC GCAAAAACTG TTACACTATT
pyc2_Val	GTTCCAAATG	GTATCGTCAC	AAAACAGAGC GCAAAAACTG TTACACTATT
pyc2_EliLilly	GTTCCAAATG	GTATCATCAC	AAAACAGAGC GCAAAAACTG TTACACTATT
	2151		2200
pyc2_Seqlab	TGGCAGACTT	GGCAGTTAAC	GGTTCTTCTA TTAAGGGTCA AATTGGCTTG
pyc2_scybr218c	TGGCAGACTT	GGCAGTTAAC	GGTTCTTCTA TTAAGGGTCA AATTGGCTTG
pyc2_Stucka	TGGCAGACTT	GGCAGTTAAC	GGTTCTTCTA TTAAGGGTCA AATTGGCTTG
pyc2_Val	TGGCAGACTT	GGCAGTTAAC	GGTTCTTCTA TTAAGGGTCA AATTGGCTTG
pyc2_EliLilly	TGGCAGACTT	GGCAGTTAAC	GGTTCTTCTA TTAAGGGTCA AATTGGCTTG

	2201		2250
pyc2_Seqlab	CCAAAACTAA AATCAAATCC AAGTGTCCCC CATTTCACAG ATGCTCAGGG		
pyc2_scybr218c	CCAAAACTAA AATCAAATCC AAGTGTCCCC CATTTCACAG ATGCTCAGGG		
pyc2_Stucka	CCAAAACTAA AATCAAATCC AAGTGTCCCC CATTTCACAG ATGCTCAGGG		
pyc2_Val	CCAAAACTAA AATCAAATCC AAGTGTCCCC CATTTCACAG ATGCTCAGGG		
pyc2_EliLilly	CCAAAACTAA AATCAAATCC AAGTGTCCCC CATTTCACAG ATGCTCAGGG		
	2251		2300
pyc2_Seqlab	CAATGTCATC AACGTTACAA AGTCTGCACC ACCATCCGGA TGGAGACAAG		
pyc2_scybr218c	CAATGTCATC AACGTTACAA AGTCTGCACC ACCATCCGGA TGGAGACAAG		
pyc2_Stucka	CAATGTCATC AACGTTACAA AGTCTGCACC ACCATCCGGA TGGAGACAAG		
pyc2_Val	CAATGTCATC AACGTTACAA AGTCTGCACC ACCATCCGGA TGGAGACAAG		
pyc2_EliLilly	CAATGTCATC AACGTTACAA AGTCTGCACC ACCATCCGGA TGGAGACAAG		
	2301		2350
pyc2_Seqlab	TGCTACTGGA AAAGGGACCA TCTGAATTTG CCAAGCAAGT CAGACAGTTC		
pyc2_scybr218c	TGCTACTGGA AAAGGGACCA TCTGAATTTG CCAAGCAAGT CAGACAGTTC		
pyc2_Stucka	TGCTACTGGA AAAGGGACCA TGTGAATTTG CCAAGCAAGT CAGACAGTTC		
pyc2_Val	TGCTACTGGA AAAGGGACCA TCTGAATTTG CCAAGCAAGT CAGACAGTTC		
pyc2_EliLilly	TGCTACTGGA AAAGGGACCA TCTGAATTTG CCAAGCAAGT CAGACAGTTC		
	2351		2400
pyc2_Seqlab	AATGGTACTC TACTGATGGA CACCACCTGG AGAGACGCTC ATCAATCTCT		
pyc2_scybr218c	AATGGTACTC TACTGATGGA CACCACCTGG AGAGACGCTC ATCAATCTCT		
pyc2_Stucka	AATGGTACTC TACTGATGGA CACCACCTGG AGAGACGCTC ATCAATCTCT		
pyc2_Val	AATGGTACTC TACTGATGGA CACCACCTGG AGAGACGCTC ATCAATCTCT		
pyc2_EliLilly	AATGGTACTC TACTGATGGA CACCACCTGG AGAGACGCTC ATCAATCTCT		
	2401		2450
pyc2_Seqlab	ACTTGCAACA AGAGTCAGAA CCCACGATTT GGCTACAATC GCTCCAACAA		
pyc2_scybr218c	ACTTGCAACA AGAGTCAGAA CCCACGATTT GGCTACAATC GCTCCAACAA		
pyc2_Stucka	ACTTGCAACA AGAGTCAGAA CCCACGATTT GGCTACAATC GCTCCAACAA		
pyc2_Val	ACTTGCAACA AGAGTCAGAA CCCACGATTT GGCTACAATC GCTCCAACAA		
pyc2_EliLilly	ACTTGCAACA AGAGTCAGAA CCCACGATTT GGCTACAATC GCTCCAACAA		

	2451		2500
pyc2_Seqlab	CCGCACATGC CCTTGCAGGT GCTTTCGCTT TAGAATGTTG GGGTGGTGCT		
pyc2_scybr218c	CCGCACATGC CCTTGCAGGT GCTTTCGCTT TAGAATGTTG GGGTGGTGCT		
pyc2_Stucka	CCGCACATGC CCTTGCAGGG GCTTTCGCTT TAGAATGTTG GGGTGGTGCG		
pyc2_Val	CCGCACATGC CCTTGCAGGT GCTTTCGCTT TAGAATGTTG GGGTGGTGCT		
pyc2_EliLilly	CCGCACATGC CCTTGCAGGT GCTTTCGCTT TAGAATGTTG GGGTGGTGCT		
	2501		2550
pyc2_Seqlab	ACATTGACG TTGCAATGAG ATTCTTGCAT GAGGATCCAT GGGAACGTCT		
pyc2_scybr218c	ACATTGACG TTGCAATGAG ATTCTTGCAT GAGGATCCAT GGGAACGTCT		
pyc2_Stucka	ACATTGACG TTGCAATGAG ATTCTTGCAT GAGGATCCAT GGGAACGTCT		
pyc2_Val	ACATTGACG TTGCAATGAG ATTCTTGCAT GAGGATCCAT GGGAACGTCT		
pyc2_EliLilly	ACATTGACG TTGCAATGAG ATTCTTGCAT GAGGATCCAT GGGAACGTCT		
	2551		2600
pyc2_Seqlab	GAGAAAATTA AGATCTCTGG TGCCTAATAT TCCATTCCAA ATGTTATTTC		
pyc2_scybr218c	GAGAAAATTA AGATCTCTGG TGCCTAATAT TCCATTCCAA ATGTTATTAC		
pyc2_Stucka	GAGAAAATTA AGATCTCTGG TGCCTAATAT TCCATTCCAA ATGTTATTGC		
pyc2_Val	GAGAAAATTA AGATCTCTGG TGCCTAATAT TCCATTCCAA ATGTTATTAC		
pyc2_EliLilly	GAGAAAATTA AGATCTCTGG TGCCTAATAT TCCATTCCAA ATGTTATTAC		
	2601		2650
pyc2_Seqlab	GTGGTGCCAA CGGTGTGGCT TACTCTTCAT TACCTGACAA TGCTATTGAC		
pyc2_scybr218c	GTGGTGCCAA CGGTGTGGCT TACTCTTCAT TACCTGACAA TGCTATTGAC		
pyc2_Stucka	GTGGTGCCAC TGGTGTGGCT TACTCTTCAT TACCTGACAA TGCTATTGAC		
pyc2_Val	GTGGTGCCAA CGGTGTGGCT TACTCTTCAT TACCTGACAA TGCTATTGAC		
pyc2_EliLilly	GTGGTGCCAA CGGTGTGGCT TACTCTTCAT TACCTGACAA TGCTATTGAC		
	2651		2700
pyc2_Seqlab	CATTTTGTCA AGCAAGCCAA GGATAATGGT GTTGATATAT TTAGAGTCTT		
pyc2_scybr218c	CATTTTGTCA AGCAAGCCAA GGATAATGGT GTTGATATAT TTAGAGTTTT		
pyc2_Stucka	CATTTTGTCA AGCAAGCCAA GGATAATGGT GTTGATATAT TTAGAGTCTT		
pyc2_Val	CATTTTGTCA AGCAAGCCAA GGATAATGGT GTTGATATAT TTAGAGTTTT		
pyc2_EliLilly	CATTTTGTCA AGCAAGCCAA GGATAATGGT GTTGATATAT TTAGAGTCTT		

	2701		2750
pyc2_Seqlab	TGATGCCTTG	AATGATTTAG	AACAATTAAA AGTTGGTGTG AATGCTGTCA
pyc2_scybr218c	TGATGCCTTG	AATGATTTAG	AACAATTAAA AGTTGGTGTG AATGCTGTCA
pyc2_Stucka	TGATGCCTTG	AATGATTTAG	AACAATTAAA AGTTGGTGTG AATGCTGTCA
pyc2_Val	TGATGCCTTG	AATGATTTAG	AACAATTAAA AGTTGGTGTG AATGCTGTCA
pyc2_EliLilly	TGATGCCTTG	AATGATTTAG	AACAATTAAA AGTTGGTGTG AATGCTGTCA
	2751		2800
pyc2_Seqlab	AGAAGGCCGG	TGGTGTGTG	GAAGCTACTG TTTGTTACTC TGGTGACATG
pyc2_scybr218c	AGAAGGCCGG	TGGTGTGTG	GAAGCTACTG TTTGTTACTC TGGTGACATG
pyc2_Stucka	AGAAGGCCGG	TGGTGTGTG	GAAGCTACTG TTTGTTACTC TGGTGACATG
pyc2_Val	AGAAGGCCGG	TGGTGTGTG	GAAGCTACTG TTTGTTACTC TGGTGACATG
pyc2_EliLilly	AGAAGGCCGG	TGGTGTGTG	GAAGCTACTG TTTGTTACTC TGGTGACATG
	2801		2850
pyc2_Seqlab	CTTCAGCCAG	GTAAGAAATA	CAACTTAGAT TACTACCTAG AAGTTGTTGA
pyc2_scybr218c	CTTCAGCCAG	GTAAGAAATA	CAACTTAGAC TACTACCTAG AAGTTGTTGA
pyc2_Stucka	CTTCAGCCAG	GTAAGAAATA	CAACTTAGAT TACTACCTAG AAGTTGTTGA
pyc2_Val	CTTCAGCCAG	GTAAGAAATA	CAACTTAGAC TACTACCTAG AAGTTGTTGA
pyc2_EliLilly	CTTCAGCCAG	GTAAGAAATA	CAACTTAGAT TACTACCTAG AAGTTGTTGA
	2851		2900
pyc2_Seqlab	AAAAATAGTT	CAAATGGGTA	CACATATCTT GGGTATTAAG GATATGGCAG
pyc2_scybr218c	AAAAATAGTT	CAAATGGGTA	CACATATCTT GGGTATTAAG GATATGGCAG
pyc2_Stucka	AAAAATAGTT	CAAATGGGTA	CACATATCTT GGGTATTAAG GATATGGCAG
pyc2_Val	AAAAATAGTT	CAAATGGGTA	CACATATCTT GGGTATTAAG GATATGGCAG
pyc2_EliLilly	AAAAATAGTT	CAAATGGGTA	CACATATCTD GGGTATTAAG GATATGGCAG
	2901		2950
pyc2_Seqlab	GTACTATGAA	ACCGGCCGCT	GCCAAATTAT TAATTGGCTC CCTAAGAACC
pyc2_scybr218c	GTACTATGAA	ACCGGCCGCT	GCCAAATTAT TAATTGGCTC CCTAAGAACC
pyc2_Stucka	GTACTATGAA	ACCGGCCGCT	GCCAAATTAT TAATTGGCTC CCTAAGAACC
pyc2_Val	GTACTATGAA	ACCGGCCGCT	GCCAAATTAT TAATTGGCTC CCTAAGAACC
pyc2_EliLilly	GTACTATGAA	ACCGGCCGCT	GCCAAATTAT TAATTGGCTC CCTAAGAACC

	2951		3000
pyc2_Seqlab	AGATATCCGG	ATTTACCAAT	TCATGTTTAC AGTCATGACT CCGCARGTAC
pyc2_scybr218c	AGATATCCGG	ATTTACCAAT	TCATGTTTAC AGTCATGACT CCGCAGGTAC
pyc2_Stucka	AGATATCCGG	ATTTACCAAT	TCATGTTTAC AGTCATGACT CCGCAAGTAC
pyc2_Val	AGATATCCGG	ATTTACCAAT	TCATGTTTAC AGTCATGACT CCGCAGGTAC
pyc2_EliLilly	AGATATCCGG	ATTTACCAAT	TCATGTTTAC AGTCATGACT CCGCAGGTAC
	3001		3050
pyc2_Seqlab	TGCGTGTTGC	GTCTATGACT	GCATGTGCCC TAGCAGGTGC TGATGTTGTC
pyc2_scybr218c	TGC.TGTTGC	GTCTATGACT	GCATGTGCCC TAGCAGGTGC TGATGTTGTC
pyc2_Stucka	TCG.TGTTGC	GTCTATGACT	GCATGTGCCC TAGCAGGTGC TGATGTTGTC
pyc2_Val	TGC.TGTTGC	GTCTATGACT	GCATGTGCCC TAGCAGGTGC TGATGTTGTC
pyc2_EliLilly	TGC.TGTTGC	GTCTATGACT	GCATGTGCCC TAGCAGGTGC TGATGTTGTC
	3051		3100
pyc2_Seqlab	GATGTAGCTA	TCAATTCAAT	GTCGGGCTTA ACTTCCCAAC CATCAATTAA
pyc2_scybr218c	GATGTAGCTA	TCAATTCAAT	GTCGGGCTTA ACTTCCCAAC CATCAATTAA
pyc2_Stucka	GATGTAGCTA	TCAATTCAAT	GTCGGGCTTA ACTTCCCAAC CATCAATTAA
pyc2_Val	GATGTAGCTA	TCAATTCAAT	GTCGGGCTTA ACTTCCCAAC CATCAATTAA
pyc2_EliLilly	GATGTAGCTA	TCAATTCAAT	GTCGGGCTTA ACTTCCCAAC CATCAATTAA
	3101		3150
pyc2_Seqlab	TGCACTGTTG	GCTTCATTAG	AAGGTAACAT TGATACTGGG ATTAACGTTG
pyc2_scybr218c	TGCACTGTTG	GCTTCATTAG	AAGGTAACAT TGATACTGGG ATTAACGTTG
pyc2_Stucka	TGCACTGTTG	GCTTCATTAG	AAGGTAACAT TGATACTGGG ATTAACGTTG
pyc2_Val	TGCACTGTTG	GCTTCATTAG	AAGGTAACAT TGATACTGGG ATTAACGTTG
pyc2_EliLilly	TGCACTGTTG	GCTTCATTAG	AAGGTAACAT TGATACTGGG ATTAACGTTG
	3151		3200
pyc2_Seqlab	AGCATGTYCG	TGAATTAGAT	GCATACTAGG GCCGAAATGA GACTGTTGTA
pyc2_scybr218c	AGCATGTTTCG	TGAATTAGAT	GCATACT.GG GCCGAAATGA GACTGTTGTA
pyc2_Stucka	AGCATGTCCG	TGAATTAGAT	GCATATA.GG GCCGAAATGA GACTGTTGTA
pyc2_Val	AGCATGTTTCG	TGAATTAGAT	GCATACT.GG GCCGAAATGA GACTGTTGTA
pyc2_EliLilly	AGCATGTTTCG	TGAATTAGAT	GCATACT.GG GCCGAAATGA GACTGTTGTA

	3201				3250
pyc2_Seqlab	TYCTTGTTTC	GAGGCCGACT	TGAAGGGMCC	AGATCCAGAA	GTTTACCAAC
pyc2_scybr218c	TTCTTGTTTC	GAGGCCGACT	TGAAGGGACC	AGATCCAGAA	GTTTACCAAC
pyc2_Stucka	TCCTTGTTTC	GAGGCCGACT	TGAAGGGCCC	AGATCCAGAA	GTTTACCAAC
pyc2_Val	TTCTTGTTTC	GAGGCCGACT	TGAAGGGACC	AGATCCAGAA	GTTTACCAAC
pyc2_EliLilly	TTCTTGTTTC	GAGGCCGACT	TGAAGGGACC	AGATCCAGAA	GTTTACCAAC
	3251				3300
pyc2_Seqlab	ATGAAATCCC	AGGTGGTCAA	TTGACTAACT	TGTTATTCCA	AGCTCAACAA
pyc2_scybr218c	ATGAAATCCC	AGGTGGTCAA	TTGACTAACT	TGTTATTCCA	AGCTCAACAA
pyc2_Stucka	ATGAAATCCC	AGGTGGTCAA	TTGACTAACT	TGTTATTCCA	AGCTCAACAA
pyc2_Val	ATGAAATCCC	AGGTGGTCAA	TTGACTAACT	TGTTATTCCA	AGCTCAACAA
pyc2_EliLilly	ATGAAATCCC	AGGTGGTCAA	TTGACTAACT	TGTTATTCCA	AGCTCAACAA
	3301				3350
pyc2_Seqlab	CTGGGTCTTG	GTGAACAATG	GGCTGAAACT	AAAAGAGCTT	ACAGAGAAGC
pyc2_scybr218c	CTGGGTCTTG	GTGAACAATG	GGCTGAAACT	AAAAGAGCTT	ACAGAGAAGC
pyc2_Stucka	CTGGGTCTTG	GTGAACAATG	GGCTGAAACT	AAAAGAGCTT	ACAGAGAAGC
pyc2_Val	CTGGGTCTTG	GTGAACAATG	GGCTGAAACT	AAAAGAGCTT	ACAGAGAAGC
pyc2_EliLilly	CTGGGTCTTG	GTGAACAATG	GGCTGAAACT	AAAAGAGCTT	ACAGAGAAGC
	3351				3400
pyc2_Seqlab	CAATTACCTA	CTGGGAGATA	TTGTTAAAAGT	TACCCCAACT	TCTAAGGTTG
pyc2_scybr218c	CAATTACCTA	CTGGGAGATA	TTGTTAAAAGT	TACCCCAACT	TCTAAGGTTG
pyc2_Stucka	CAATTACCTA	CTGGGAGATA	TTGTTAAAAGT	TACCCCAACT	TCTAAGGTTG
pyc2_Val	CAATTACCTA	CTGGGAGATA	TTGTTAAAAGT	TACCCCAACT	TCTAAGGTTG
pyc2_EliLilly	CAATTACCTA	CTGGGAGATA	TTGTTAAAAGT	TACCCCAACT	TCTAAGGTTG
	3401				3450
pyc2_Seqlab	TCGGTGATTT	AGCTCAATTC	ATGGTTTCTA	ACAAACTGAC	TTCCGACGAT
pyc2_scybr218c	TCGGTGATTT	AGCTCAATTC	ATGGTTTCTA	ACAAACTGAC	TTCCGACGAT
pyc2_Stucka	TCGGTGATTT	AGCTCAATTC	ATGGTTTCTA	ACAAACTGAC	TTCCGACGAT
pyc2_Val	TCGGTGATTT	AGCTCAATTC	ATGGTTTCTA	ACAAACTGAC	TTCCGACGAT
pyc2_EliLilly	TCGGTGATTT	AGCTCAATTC	ATGGTTTCTA	ACAAACTGAC	TTCCGACGAT

	3451				3500
pyc2_Seqlab	ATTAGACGTT	TAGCTAATTC	TTTGGACTTT	CCTGACTCTG	TTATGGACTT
pyc2_scybr218c	ATTAGACGTT	TAGCTAATTC	TTTGGACTTT	CCTGACTCTG	TTATGGACTT
pyc2_Stucka	ATTAGACGTT	TAGCTAATTC	TTTGGACTTT	CCTGACTCTG	TTATGGACTT
pyc2_Val	ATTAGACGTT	TAGCTAATTC	TTTGGACTTT	CCTGACTCTG	TTATGGACTT
pyc2_EliLilly	ATTAGACGTT	TAGCTAATTC	TTTGGACTTT	CCTGACTCTG	TTATGGACTT
	3501				3550
pyc2_Seqlab	TTTTGAAGGT	TTAATTGGTC	AACCATACGG	TGGGTTCCCA	GAACCATTA
pyc2_scybr218c	TTTTGAAGGT	TTAATTGGTC	AACCATACGG	TGGGTTCCCA	GAACCATTA
pyc2_Stucka	TTTTGAAGGT	TTAATTGGTC	AACCATACGG	TGGGTTCCCA	GAACCATTA
pyc2_Val	TTTTGAAGGT	TTAATTGGTC	AACCATACGG	TGGGTTCCCA	GAACCATTA
pyc2_EliLilly	TTTTGAAGGT	TTAATTGGTC	AACCATACGG	TGGGTTCCCA	GAACCATTA
	3551				3600
pyc2_Seqlab	GATCTGATGT	ATTGAGAAAC	AAGAGAAGAA	AGTTGACGTG	CCGTCCAGGT
pyc2_scybr218c	GATCTGATGT	ATTGAGAAAC	AAGAGAAGAA	AGTTGACGTG	CCGTCCAGGT
pyc2_Stucka	GATCTGATGT	ATTGAGAAAC	AAGAGAAGAA	AGTTGACGTG	CCGTCCAGGT
pyc2_Val	GATCTGATGT	ATTGAGAAAC	AAGAGAAGAA	AGTTGACGTG	CCGTCCAGGT
pyc2_EliLilly	GATCTGATGT	ATTGAGAAAC	AAGAGAAGAA	AGTTGACGTG	CCGTCCAGGT
	3601				3650
pyc2_Seqlab	TTAGAATTAG	AACCATTTGA	TCTCGAAAAA	ATTAGAGAAG	ACTTGCAGAA
pyc2_scybr218c	TTAGAATTAG	AACCATTTGA	TCTCGAAAAA	ATTAGAGAAG	ACTTGCAGAA
pyc2_Stucka	TTAGAATTAG	AACCATTTGA	TCTCGAAAAA	ATTAGAGAAG	ACTTGCAGAA
pyc2_Val	TTAGAATTAG	AACCATTTGA	TCTCGAAAAA	ATTAGAGAAG	ACTTGCAGAA
pyc2_EliLilly	TTAGAATTAG	AACCATTTGA	TCTCGAAAAA	ATTAGAGAAG	ACTTGCAGAA
	3651				3700
pyc2_Seqlab	CAGATTCGGT	GATATTGATG	AATGCGATGT	TGCTTCTWAC	AATATGTATC
pyc2_scybr218c	CAGATTCGGT	GATATTGATG	AATGCGATGT	TGCTTCTTAC	AATATGTATC
pyc2_Stucka	CAGATTCGGT	GATATTGATG	AATGCGATGT	TGCTTCTAAC	AATATGTATC
pyc2_Val	CAGATTCGGT	GATATTGATG	AATGCGATGT	TGCTTCTTAC	AATATGTATC
pyc2_EliLilly	CAGATTCGGT	GATATTGATG	AATGCGATGT	TGCTTCTTAC	AATATGTATC

	3701		3750
pyc2_Seqlab	CAAGGGTCTA	TGAAGATTTC	CAAAAGATCA GAGAAACATA CGGTGATTTA
pyc2_scybr218c	CAAGGGTCTA	TGAAGATTTC	CAAAAGATCA GAGAAACATA CGGTGATTTA
pyc2_Stucka	CAAGGGTCTA	TGAAGATTTC	CAAAAGATCA GAGAAACATA CGGTGATTTA
pyc2_Val	CAAGGGTCTA	TGAAGATTTC	CAAAAGATCA GAGAAACATA CGGTGATTTA
pyc2_EliLilly	CAAGGGTCTA	TGAAGATTTC	CAAAAGATCA GAGAAACATA CGGTGATTTA
	3751		3800
pyc2_Seqlab	TCAGTTCTAC	CAACCAAAAA	TTTCCTAGCA CCAGCAGAAC CTGATGAAGA
pyc2_scybr218c	TCAGTTCTAC	CAACCAAAAA	TTTCCTAGCA CCAGCAGAAC CTGATGAAGA
pyc2_Stucka	TCAGTTCTAC	CAACCAAAAA	TTTCCTAGCA CCAGCAGAAC CTGATGAAGA
pyc2_Val	TCAGTTCTAC	CAACCAAAAA	TTTCCTAGCA CCAGCAGAAC CTGATGAAGA
pyc2_EliLilly	TCAGTTCTAC	CAACCAAAAA	TTTCCTAGCA CCAGCAGAAC CTGATGAAGA
	3801		3850
pyc2_Seqlab	AATCGAAGTC	ACCATCGAAC	AAGGTAAGAC TTTGATTATC AAATTGCAAG
pyc2_scybr218c	AATCGAAGTC	ACCATCGAAC	AAGGTAAGAC TTTGATTATC AAATTGCAAG
pyc2_Stucka	AATCGAAGTC	ACCATCGAAC	AAGGTAAGAC TTTGATTATC AAATTGCAAG
pyc2_Val	AATCGAAGTC	ACCATCGAAC	AAGGTAAGAC TTTGATTATC AAATTGCAAG
pyc2_EliLilly	AATCGAAGTC	ACCATCGAAC	AAGGTAAGAC TTTGATTATC AAATTGCAAG
	3851		3900
pyc2_Seqlab	CTGTTGGTGA	CTTAAATAAG	AAAACTGGGC AAAGAGAAGT GTATTTTGAA
pyc2_scybr218c	CTGTTGGTGA	CTTAAATAAG	AAAACTGGGC AAAGAGAAGT GTATTTTGAA
pyc2_Stucka	CTGTTGGTGA	CTTAAATAAG	AAAACTGGGC AAAGAGAAGT GTATTTTGAA
pyc2_Val	CTGTTGGTGA	CTTAAATAAG	AAAACTGGGC AAAGAGAAGT GTATTTTGAA
pyc2_EliLilly	CTGTTGGTGA	CTTAAATAAG	AAAACTGGGC AAAGAGAAGT GTATTTTGAA
	3901		3950
pyc2_Seqlab	TTGAACGGTG	AATTAAGAAA	GATCAGAGTT GCAGACAAGT CACAAAACAT
pyc2_scybr218c	TTGAACGGTG	AATTAAGAAA	GATCAGAGTT GCAGACAAGT CACAAAACAT
pyc2_Stucka	TTGAACGGTG	AATTAAGAAA	GATCAGAGTT GCAGACAAGT CACAAAACAT
pyc2_Val	TTGAACGGTG	AATTAAGAAA	GATCAGAGTT GCAGACAAGT CACAAAACAT
pyc2_EliLilly	TTGAACGGTG	AATTAAGAAA	GATCAGAGTT GCAGACAAGT CACAAAACAT

	3951		4000
pyc2_Seqlab	ACAATCTGTT	GCTAAACCAA	AGGCTGATGT CCACGATACT CACCAAATCG
pyc2_scybr218c	ACAATCTGTT	GCTAAACCAA	AGGCTGATGT CCACGATACT CACCAAATCG
pyc2_Stucka	ACAATCTGTT	GCTAAACCAA	AGGCTGATGT CCACGATACT CACCAAATCG
pyc2_Val	ACAATCTGTT	GCTAAACCAA	AGGCTGATGT CCACGATACT CACCAAATCG
pyc2_EliLilly	ACAATCTGTT	GCTAAACCAA	AGGCTGATGT CCACGATACT CACCAAATCG
	4001		4050
pyc2_Seqlab	GTGCACCAAT	GGCTGGTGTT	ATCATAGAAG TTAAAGTACA TAAAGGGTCT
pyc2_scybr218c	GTGCACCAAT	GGCTGGTGTT	ATCATAGAAG TTAAAGTACA TAAAGGGTCT
pyc2_Stucka	GTGCACCAAT	GGCTGGTGTT	ATCATAGAAG TTAAAGTACA TAAAGGGTCT
pyc2_Val	GTGCACCAAT	GGCTGGTGTT	ATCATAGAAG TTAAAGTACA TAAAGGGTCT
pyc2_EliLilly	GTGCACCAAT	GGCTGGTGTT	ATCATAGAAG TTAAAGTACA TAAAGGGTCT
	4051		4100
pyc2_Seqlab	TTGGTGAAGA	AGGGCGAATC	GATTGCTGTT TTGAGTGCCA TGAAAATGGA
pyc2_scybr218c	TTGGTGAAAA	AGGGCGAATC	GATTGCTGTT TTGAGTGCCA TGAAAATGGA
pyc2_Stucka	TTGGTGAAGA	AGGGCGAATC	GATTGCTGTT TTGAGTGCCA TGAAAATGGA
pyc2_Val	TTGGTGAAAA	AGGGCGAATC	GATTGCTGTT TTGAGTGCCA TGAAAATGGA
pyc2_EliLilly	TTGGTGAAAA	AGGGCGAATC	GATTGCTGTT TTGAGTGCCA TGAAAATGGA
	4101		4150
pyc2_Seqlab	AATGGTTGTC	TCTTCACCAG	CAGATGGTCA AGTTAAAGAT GTTTTCATTA
pyc2_scybr218c	AATGGTTGTC	TCTTCACCAG	CAGATGGTCA AGTTAAAGAC GTTTTCATTA
pyc2_Stucka	AATGGTTGTC	TCTTCACCAG	CAGATGGTCA AGTTAAAGAT GTTTTCATTA
pyc2_Val	AATGGTTGTC	TCTTCACCAG	CAGATGGTCA AGTTAAAGAC GTTTTCATTA
pyc2_EliLilly	AATGGTTGTC	TCTTCACCAG	CAGATGGTCA AGTTAAAGAT GTTTTCATTA
	4151		4200
pyc2_Seqlab	GGGATGGTGA	AAGTGTTGAC	GCATCAGATT TGTTGGTTGT CCTAGAAGAA
pyc2_scybr218c	AGGATGGTGA	AAGTGTTGAC	GCATCAGATT TGTTGGTTGT CCTAGAAGAA
pyc2_Stucka	GGGATGGTGA	AAGTGTTGAC	GCATCAGATT TGTTGGTTGT CCTAGAAGAA
pyc2_Val	AGGATGGTGA	AAGTGTTGAC	GCATCAGATT TGTTGGTTGT CCTAGAAGAA
pyc2_EliLilly	GGGATGGTGA	AAGTGTTGAC	GCATCAGATT TGTTGGTTGT CCTAGAAGAA

	4201		4250
pyc2_Seqlab	GAAACCTAC	CCCCATCCC. AAAAAAAGTA	ATTTTACTC GTTAATTAAA
pyc2_scybr218c	GAAACCTAC	CCCCATCCC. AAAAAAAGTA	ATTTTACTC GTTAATTATA
pyc2_Stucka	GAAACCTAC	CCCCATCCCC AAAAAAAGTA	ATTTTACTC GTTAATTAAA
pyc2_Val	GAAACCTAC	CCCCATCCC. AAAAAAAGTA	ATTTTACTC GTTAATTATA
pyc2_EliLilly	GAAACCTAC	CCCCATCCC. AAAAAAAGTA	ATTTTACTC GTTAATTAAA
	4251		4300
pyc2_Seqlab	GCTTCC....	.CGGGAATTC CGATCCAGAC	ATGATAAGAT ACATTGATGA
pyc2_scybr218c	TTTTATGACA	TCTGAAAATA CTAGCTGTAC	TATATATGGC GTATATTTTA
pyc2_Stucka	GCTTCCCGGG
pyc2_Val	TTTTATGACA	TCTGAAAATA CTAGCTGTAC	TATATATGGC GTATATTTTA
pyc2_EliLilly	GCTTCCCGGG
	4301		4350
pyc2_Seqlab	GTTTGGACAA	ACCACAACCTA GAATGCAGTG	AAAAAATGC TTTATTTGTG
pyc2_scybr218c	TCTAGTTATG	TTCCCATGTA TATTTAAATG	CCAAATAGAA AGTAATCAAA
pyc2_Stucka
pyc2_Val	TCTAGTTATG	TTCCCATGTA TATTTAAA..
pyc2_EliLilly
	4351		4400
pyc2_Seqlab	AAATTTGTGA	TGCTATTGCT TTATTTGTAA	CCATTATAAG CTGCAATAAA
pyc2_scybr218c	CACTTTCGAT	GAAATACGTG CTAAGTGTGT	TTCTTCCTTA ATGCTTTCAC
pyc2_Stucka
pyc2_Val
pyc2_EliLilly
	4401		4450
pyc2_Seqlab	CAAGTTAACA	ACAACAATTG CATTCAATTTT	ATGTTTCAGG TTCAAGGGGA
pyc2_scybr218c	TTACCATGTC	TCCATTCTCC ATTTTCTTCT	TGAGTGAAAA TGTGAGTTTA
pyc2_Stucka
pyc2_Val
pyc2_EliLilly

	4451				4500
pyc2_Seqlab	AGGTGGTGGG	AGGTTTTTTA	AAGCAAGTAA	AACCTCTACA	AATGTGGTAT
pyc2_scybr218c	TAACGCTC..	AAGTACGTTA	ACTACTCTAT	TTAATATCGT	ACGGGATTTT
pyc2_Stucka
pyc2_Val
pyc2_EliLilly
	4501				4550
pyc2_Seqlab	GGCTGATTAA	TGATCCGGCT	GCCTCGCGCG	TTTCGGTGAT	GACGGTGAAA
pyc2_scybr218c	TGATCGACTG	TAGGTTTTCT	TCTTAGACCA	TTCCAGCGCC	CGGGTATTTA
pyc2_Stucka
pyc2_Val
pyc2_EliLilly
	4551				4600
pyc2_Seqlab	ACCTCTGACA	CATGCAGCTC	CCGGAGACGG	TCACAGCTTG	TCTGTAAGCG
pyc2_scybr218c
pyc2_Stucka
pyc2_Val
pyc2_EliLilly
	4601				4650
pyc2_Seqlab	GATGCCGGGA	GCAGACAAGC	CCGTCAGGGC	GCGTCAGCGG	GTGTTGGCGG
pyc2_scybr218c
pyc2_Stucka
pyc2_Val
pyc2_EliLilly
	4651				4700
pyc2_Seqlab	GTGTCGGGGC	GCAGCCATGA	CCCAGTCACG	TAGCGATAGC	GGAGTGTATA
pyc2_scybr218c
pyc2_Stucka
pyc2_Val
pyc2_EliLilly

	4701				4750
pyc2_Seqlab	CTGGCTTAAC	TATGCGGCAT	CAGAGCAGAT	TGTCTGAGAG	TGCACCATAT
pyc2_scybr218c
pyc2_Stucka
pyc2_Val
pyc2_EliLilly
	4751				4800
pyc2_Seqlab	CGGGCCGCGT	TGCTGGCGTT	TTTCCATAGG	CTCCGCCCCC	CTGACGAGCA
pyc2_scybr218c
pyc2_Stucka
pyc2_Val
pyc2_EliLilly
	4801				4850
pyc2_Seqlab	TCACAAAAAT	CGACGCTCAA	GTCAGAGGTG	GCGAAACCCG	ACAGGACTAT
pyc2_scybr218c
pyc2_Stucka
pyc2_Val
pyc2_EliLilly
	4851				4900
pyc2_Seqlab	AAAGATACCA	GGCGTTTCCC	CTGGAAGCTC	CTCGTGCGCT	CTTCTGTTCC
pyc2_scybr218c
pyc2_Stucka
pyc2_Val
pyc2_EliLilly
	4901				4950
pyc2_Seqlab	GACCCTGCCG	CTTCCGGATC	CTGTCCGCCT	TTCTCCTTCG	GGAAGCGTGG
pyc2_scybr218c
pyc2_Stucka
pyc2_Val
pyc2_EliLilly

	4951		5000
pyc2_Seqlab	GGCTTTTTC	ATAGCTTACGC	TGGAGGTATC TTAGTTCGTG TAGGGCGTTC
pyc2_scybr218c
pyc2_Stucka
pyc2_Val
pyc2_EliLilly

	5001		5034
pyc2_Seqlab	GCTTCAAGCT	GGCTGGGTGC	CCAACCCCCC GTCA
pyc2_scybr218c
pyc2_Stucka
pyc2_Val
pyc2_EliLilly